ONDERZOEKINGEN OVER TRACHEOMYCOSEN

RUTGER VAN DER VEEN

ONDERZOEKINGEN OVER TRACHEOMYCOSEN

ONDERZOEKINGEN OVER TRACHEOMYCOSEN

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD VAN DOCTOR IN DE WIS- EN NATUURKUNDE AAN DE RIJKS-UNIVERSITEIT TE UTRECHT, OP GEZAG VAN DEN RECTOR MAGNIFICUS Dr. A. A. PULLE, HOOGLEERAAR IN DE FACULTEIT DER WIS- EN NATUURKUNDE, VOLGENS BESLUIT VAN DEN SENAAT DER UNIVERSITEIT TE VERDEDIGEN TEGEN DE BEDENKINGEN VAN DE FACULTEIT DER WIS- EN NATUURKUNDE OP MAANDAG 3 MAART 1930, DES NAMIDDAGS TE DRIE UUR

DOOR

RUTGER VAN DER VEEN

GEBOREN TE BANDOENG

BAARN — N. V. HOLLANDIA-DRUKKERIJ — 1930

AAN MIJN OUDERS

Het is me een aangename taak om, bij het beëindigen van mijn studietijd aan de universiteit, mijn hartelijken dank uit te spreken aan allen, die mij deze jaren tot een zoo belangrijk tijdperk in mijn leven gemaakt hebben.

U, Hooggeleerde Janse, van Kampen, Escher, Keesom en Blanksma ben ik zeer dankbaar voor de heldere colleges en practica, die ik gedurende mijn eerste studiejaren genoten heb.

U, Zeergeleerde Boschma en van der Klaauw dank ik ten zeerste voor de niet genoeg te waardeeren leiding, bij mijn eerste zoölogische practica.

U, Hooggeleerde Went, Jordan, Pulle en de Bussy zal ik altijd zeer dankbaar blijven voor mijn verdere ontwikkeling als bioloog.

Hooggeleerde Westerdijk, Hooggeachte Promotrix, het is niet gemakkelijk om mijn dankbaarheid jegens U onder woorden te brengen. Mijn laatste studiejaren hebt Gij gemaakt tot een buitengewoon aangename tijd, waarin goede leiding en groote opgewektheid een ideale omgeving maakten voor het tot stand komen van een dissertatie.

Zeer geachte van Luijk, steeds zal ik Uwe groote hulpvaardigheid als een dankbare herinnering blijven bewaren.

INHOUD

blz.

Hoofdstuk I. INLEIDING 1

Hoofdstuk II. ZIEKTEBEELD EN BESCHRIJVING DER VEROORZAKERS.

1. De Verticillium-ziekte van tomaten 5
   a. Verschijnselen 5
   b. De Fungus 6
2. De Fusarium-ziekte van asters 12
   a. Verschijnselen 12
   b. De Fungus 13
3. Vergelijking tusschen Fusarium en Verticillium alboatrum 13

Hoofdstuk III. VOEDINGSPHYSIOLOGIE VAN DE SCHIMMELS IN REINCULTURE.

1. Methodiek 17
2. Verticillium alboatrum 19
   a. Invloed van koolhydraten 19
   b. Invloed van den zuurgraad 21
   c. Invloed van mineralen 24
   d. Invloed van de stikstofbron 27
3. Enkele Fusarien uit de sectie Elegans 36
   a. Invloed van koolhydraten 36
   b. Invloed van den zuurgraad 37
   c. Invloed van mineralen 38
   d. Invloed van de stikstofbron 40
4. Verschillen tusschen Fusarium sp. en Verticillium alboatrum . . . 45

Hoofdstuk IV. INVLOED VAN DE STIKSTOFBEMESTING OP DE INFECTIE.

1. Methodiek 48
2. Fusarium-infectie bij asters 49
3. Verticillium-infectie bij tomaten 54

Hoofdstuk V. DE ROL VAN TOXINEN BIJ DE VERWELKINGSZIEKTEN 59

blz.
Hoofdstuk VI. OVER DE MOGELIJKHEID VAN IMMUNISATIE BIJ PLANTEN 70
Hoofdstuk VII. SAMENVATTING 81
LITTERATUURLIJST 84

HOOFDSTUK I

INLEIDING

Verscheidene parasitaire plantenziekten geven aanleiding tot een plotseling verwelken van de aangetaste planten, en het zou voor de hand liggen om al deze ziekten verwelkingsziekten te noemen, daar de ziektebeelden op het eerste gezicht een groote overeenkomst vertoonen. De oorzaken voor het verwelken kunnen echter zeer verschillend zijn. Vaak zal men te doen hebben met een wortelrot, waardoor het wortelstelsel zoodanig beschadigd wordt, dat geen voldoende water meer opgenomen kan worden.

In andere gevallen zijn de parasieten in de houtvaten doorgedrongen, waarin zij zich verder ontwikkelen, en het vaatstelsel zoodanig beschadigen, dat de waterbeweging ernstig verstoord wordt, terwijl de rest van het plantenweefsel onaangetast blijft. Dergelijke ziekten dragen de naam van „Tracheomycosen" en als in dit werk over verwelkingsziekten gesproken wordt, zullen steeds tracheomycosen bedoeld worden.

Bij de planten, die aan dergelijke tracheomycosen lijden, zien we op warme dagen plotseling een geheel of gedeeltelijk verwelken optreden, meestal nadat enkele dagen tevoren eenige gele of geel gevlekte blaadjes aanduiden, dat de schimmel, die de ziekte veroorzaakt, bezig is zich binnen in de plant te ontwikkelen. In een vochtige en koele omgeving kunnen de verwelkte planten zich soms weer herstellen, doch dit herstel is slechts schijnbaar, daar de schimmel voortgaat met zich te ontwikkelen en de plant tenslotte afsterft.

De schimmels, die tracheomycosen veroorzaken, leven gewoonlijk

in den grond of in de waterbanen van zieke planten en zijn dus, wat hun voeding betreft, aangewezen op de zouten en organische stoffen, die in den grond voorkomen, en die door de plant opgenomen worden. Het is dus zeer waarschijnlijk, dat de bemesting van den grond een groote invloed zal hebben op de infectie en op het verloop der ziekte.

In de phytopathologische litteratuur vinden we talrijke onsamenhangende opgaven over den invloed van bepaalde bemestingszouten op bepaalde infecties. Een goed opgezet systematisch onderzoek hierover verscheen in 1927 van de hand van Schaffnit & Volk (59). Zij onderzochten een groot aantal planten met hun parasieten in zandcultures met verschillende bemestingszouten, en vonden, dat elk element ongeveer denzelfden invloed had op de infectie bij al die verschillende planten. Het meest resistent zijn altijd de planten met een uitgesproken stikstof- of phosphorgebrek. Kaligebrek en stikstofovermaat veroorzaken steeds een verhoogde gevoeligheid bij planten. Bij het infecteeren van tomatenplanten met Cladosporium fulvum bleek dat de verschillende voeding niet alleen op de kwantiteit der parasiet werkt maar ook op de kwaliteit. Bij kaliovermaat werden geïnfecteerde plaatsen bedekt met een bruinzwart laagje schimmel met een gele zoom. Bij stikstofovermaat werd het schimmellaagje donkerviolet, bij phosphorovermaat geelbruin.

Geheel verklaren kunnen zij deze invloed der voedingszouten niet, hoewel enkele eigenschappen der plant als het suikergehalte en de amylasevorming gedeeltelijk correlaat gaan met gevoeligheid voor de parasiet.

Schaffnit & Volk letten echter uitsluitend op de hoeveelheid van de toegevoegde elementen, niet op den vorm, waarin deze elementen gegeven werden. Daar schimmels echter vaak wel degelijk onder den invloed staan van de verbindingen, en niet alleen van de hoeveelheid van het element, vooral waar het stikstof betreft, leek het me wenschelijk om te onderzoeken of deze invloed ook te voorschijn komt bij de infectie van de schimmel op planten.

De schimmels dringen meestal door de wortels van de plant en ontwikkelen zich dan verder in de houtvaten. Vroeger veronderstelde men dat in deze vaten kluwens van mycelium gevormd

werden en dat daardoor de waterbeweging in de plant verstoord werd. Daar echter nooit zooveel mycelium aangetroffen wordt, meent men thans dat het verwelken veroorzaakt wordt door schadelijke stoffen, die door de schimmels in de waterbanen afgescheiden worden. De bruine verkleuring der vaten, veel verder dan de plaatsen waar de schimmel zich ontwikkeld heeft, duidt op de juistheid van deze verklaring. In bijna alle nieuwe litteratuur over verwelkingsziekten wordt een groot gedeelte van het onderzoek gewijd aan deze schadelijke stoffen. Er wordt over het algemeen veel waarde aan gehecht en soms worden ze zelfs beschouwd als de speciale aanvalsmiddelen van de schimmels der tracheomycosen. Haymaker (33) vond, dat resistente planten minder gevoelig waren voor deze toxinen dan planten die gemakkelijker te infecteeren waren. Evenzoo vond hij, dat virulente stammen van schimmels sterker toxinen vormen, dan minder virulente stammen. Daar echter gebleken is, dat zuiver saprophytisch levende schimmels vaak even sterke toxinen maken als deze parasieten, lijkt me de waarde ervan overdreven te worden.

De enkele theoretische beschouwingen over den aard dezer toxinen zijn allen ook nog zeer voor kritiek vatbaar, en het zou zeer wenschelijk zijn, dat dit probleem meer in handen kwam van biochemici, dan van botanici.

Ik heb me in deze verhandeling tot taak gesteld om, na een bespreking van de parasitaire schimmels, eerst de invloed van verschillende elementen en stikstofverbindingen op den groei van de schimmels in reinculture na te gaan. Daarna heb ik onderzocht, of die verbindingen, waarvoor de schimmels in reinculture een voorkeur vertoonen, ook een infectieverhoogende werking hebben, als zij als bemesting gegeven worden aan de planten.

De schimmels, die ik onderzocht, waren Verticillium alboatrum Rke & Berth, de veroorzaker van een verwelkingsziekte bij vele verschillende planten, o.a. bij tomaten, en Fusarium conglutinans Wr var. callistephi Beach, veroorzaker van verwelkingsziekte bij Chineesche asters. Oorspronkelijk was het de bedoeling om te onderzoeken Fusarium Lycopersici Sacc., die ook op tomaten parasiteert, doch daar de infectie hiermede in ons klimaat slechts zelden gelukt, heb ik inplaats daarvan de Fusarium der asters gebruikt.

Als slot van deze onderzoekingen volgt een kritiek op de gangbare meeningen over de aard der door de schimmels afgescheiden toxinen bij verwelkingsziekten aan de hand van enkele experimenten met de stoffen, door Verticillium alboatrum in reincultures afgescheiden.

Daar verschillende auteurs door injecties met dergelijke, in schimmelcultures gevormde stoffen, in planten er soms in slaagden om een zekere immuniteit tegen deze schimmels in het leven te roepen, en het grootste deel der litteratuur hierover voor Nederlandsche onderzoekers vrij ontoegankelijk is, geef ik een litteratuuroverzicht over dit onderwerp aan het slot van dit werk.

HOOFDSTUK II

ZIEKTEBEELD EN BESCHRIJVING DER VEROORZAKERS

§ 1. De Verticillium-ziekte van Tomaten

a. Verschijnselen

Duidelijke symptomen van deze ziekte treden gewoonlijk pas op als de planten zich zoover ontwikkeld hebben, dat er al enkele bloemen opengegaan zijn, hoewel onder voor de infectie gunstige omstandigheden evengoed veel jongere planten een duidelijk ziektebeeld kunnen vertoonen. De eerste uiting van de ziekte is, dat de onderste bladeren gele vlekken krijgen, slap worden en ten slotte afvallen. Heeft de infectie zich verder uitgebreid, dan zien we vaak het verschijnsel, dat een aantal bladeren recht boven elkaar gele vlekken krijgen en slap gaan hangen. Dit wijst erop, dat aan de eene zijde de vaten al sterk aangetast zijn, terwijl aan de andere zijde de infectie nog lang niet zoover is voortgeschreden. 's Nachts, als het kouder en vochtiger is, herstellen de meeste planten zich, meestal echter slechts om de volgende dag een nog sterkere verwelking te vertoonen. Dit telkens verwelken der aangetaste planten is de oorzaak ervan dat men in de praktijk de ziekte vaak aanduidt met de naam „slaapziekte". Als de omstandigheden gunstig blijven voor de infectie, dan kunnen de planten al ongeveer een maand na de infectie geheel te gronde gaan. Meestal echter zijn de omstandigheden niet zoo gunstig, daar bij het verloop van deze ziekte de temperatuur een groote rol speelt.

Het is de groote verdienste van Bewley geweest (16) om

deze invloed nader uitgewerkt te hebben, en hij vond, dat de infectie tusschen ongeveer 17 gr. en 20 gr. het sterkst optreedt, terwijl er boven de 25 gr. nooit meer een infectie plaats heeft, en dat zelfs de reeds geïnfecteerde planten zich bij temperaturen boven de 25 graden weer gaan herstellen en de schimmels in de vaten verdringen, zoodat na een dag of veertien gewoonlijk uit een plant, die sterk geïnfecteerd is geweest, Verticillium niet meer te isoleeren is.

In de praktijk richt deze Verticilliumziekte een vrij groote schade aan. In warme kassen is door regeling van de temperatuur de ziekte wel in bedwang te houden, maar in de warenhuizen hebben de planten, als de schimmel eenmaal in den grond zit, er zeer veel van te lijden. Het eenige middel, om de ziekte daar te bestrijden is het steriliseeren van den grond, hetgeen altijd groote kosten met zich meebrengt. Williams (69) heeft talrijke proeven gedaan om de ziekte te bestrijden door verschillende ontsmettende stoffen in de grond te brengen, doch hij bereikte slechts weinig gunstige resultaten ermede.

b. De Fungus

Litteratuur

Verticillium alboatrum werd in 1879 voor het eerst beschreven door Reinke & Berthold (52). Zij hebben niet met reinculturen gewerkt, doch alleen de schimmel beschreven, zooals deze zich ontwikkelt op de stengels van de geïnfecteerde aardappelplanten, waarop hij gevonden werd. Hierdoor verliest de beschrijving, die overigens uitgebreid en duidelijk genoeg is, veel van haar waarde, en we zien dan ook, dat in de latere litteratuur verschil van meening gaat optreden omtrent de soort of de vorm, die zij in handen hebben gehad. Het is vooral de beschrijving van het rustmycelium, dat hiertoe aanleiding geeft. Dit bestaat uit dikke hyphen met zeer vele dwarswanden, waarvan de cellen opzwellen tot kogelronde lichaampjes, die snoervormig achter elkaar liggen. Eenige van zulke snoeren leggen zich tegen elkaar aan en groeien om elkaar heen, zoodat er een klein sclerotium ontstaat. Nooit zagen zij cellen, die zijdelings afgesnoerd werden, steeds lagen ze in een enkele rij achter elkaar.

Van Hook (37) beschrijft in 1904 een schimmel, geïsoleerd uit Panax, onder de naam van Acrostalagmus albus, die waarschijnlijk dezelfde is als Verticillium alboatrum. Twee jaar later beschrijft Bainier (5) Acrostalagmus nigripes, die evenzoo wel identiek zal zijn met V. alboatrum.

Nadat nog eenige malen deze Verticillium als een nieuwe Acrostalagmussoort beschreven was, verscheen in 1913 een publicatie van Klebahn (40), waarin hij een nieuwe Verticillium beschrijft, V. Dahliae, die in enkele opzichten van V. alboatrum verschilt. Deze soort maakt n.l. de microsclerotien wel degelijk door laterale wanden, en niet door dwarswanden alleen, zooals V. alboatrum van Reinke & Berthold.

Bewley (16) onderzoekt in 1922 een groot aantal stammen van V. alboatrum, en vindt, dat er alle overgangen zijn van stammen die zeer veel, tot stammen die geen sclerotien maken, van stammen die bijna geheel zwart worden tot stammen die zuiver wit blijven. Hij verdeelt ze in zes groepen, naar gelang er meer of minder sclerotien gevormd worden, maar deze indeeling is natuurlijk meer van practisch nut, dan van systematische waarde.

In 1925 verschijnt een publicatie van van der Meer (46), die de nomenclatuur van Klebahn overneemt, en uit talrijke en zeer verschillende planten zoowel V. Dahliae als V. alboatrum isoleerde en nog meer planten ermede kon infecteeren. Beide soorten zijn weinig gespecialiseerde parasieten.

Berkeley & Jackson (14) beschrijven in 1926 een nieuwe soort, Verticillium ovatum, die slechts zeer weinig van V. Dahliae Kleb. verschilt. Later in 1927 (12) en in 1928 (13) geeft Berkeley de volgende indeeling van de betreffende Verticilliumvormen: 1. De Dahliae groep die veel microsclerotien vormt en waartoe V. Dahliae Kleb. en V. ovatum Berk. & Jacks. behooren. 2. De alboatrum-groep die geen microsclerotien vormt, doch slechts donker gekleurd mycelium. 3. De album-groep, die wit blijft in reincultuur. De eerste groep is weer onderverdeeld in twee secties, waarvan de een, sectie Bicolor, veel wit luchtmycelium maakt, de ander, sectie Niger, slechts weinig of geen luchtmycelium vormt.

Weer later, in 1929, geeft Wollenweber (70) een nieuwe indeeling en brengt hij alle vormen samen onder de naam V. al-

boatrum. Deze wordt dan gesplitst in een aantal varieteiten, terwijl de grondvorm die is, welke Klebahn V. Dahliae genoemd heeft. Hij is ervan overtuigd, dat Reinke & Berthold bij hun beschrijving deze vorm gebruikten. Ook V. ovatum Berk. & Jacks. is een vertegenwoordiger hiervan, en is dus identiek met V. Dahliae.

De variëteit Caespitosum omvat de vormen, die Klebahn, Van der Meer, enz. V. alboatrum noemden, en is dus die vorm, die geen sclerotien, doch wel donker mycelium maakt. Een speciale vorm hiervan is de vorm pallens van Berkeley, die wit blijft.

De variëteit chlamydosporale omvat vormen, die inplaats van sclerotien chlamydosporen maken. Een vorm hiervan, forma angustum, die bekend was onder de naam van Verticillium angustum Wr., heeft kleinere sporen.

De variëteit Medium is een tropische variëteit, die sterk thermophil is, en die hier beschreven wordt.

Bovendien toont hij aan dat de sporengrootte niet als kenmerk kan dienen om deze variëteiten van elkaar te onderscheiden.

Uit dit litteratuuroverzicht blijkt duidelijk, dat men het over de nomenclatuur van Verticillium alboatrum in ruimeren zin nog in het geheel niet eens is. Bij de meeste publicaties valt een duidelijke indeeling in twee groepen al dadelijk in het oog. Een groep, die een zwart stroma vormt, dat hoofdzakelijk bestaat uit microsclerotien; waarin zoowel laterale, als dwarswanden voorkomen, en een tweede groep, die donker wordt doordat de hyphen zich donker gaan kleuren, zonder dat de typische microsclerotien gevormd worden.

Welke van deze beide vormen Reinke en Berthold bij hun beschrijving gebruikt hebben, is blijkbaar niet geheel duidelijk, daar enkele auteurs als Klebahn en Van der Meer er niet aan twijfelen, of zij hadden de tweede vorm in hun materiaal, terwijl anderen, waaronder Wollenweber, ervan overtuigd zijn dat zij te doen hadden met de eerste vorm. Beide opvattingen zijn te verdedigen, en hangen af van de plaats, waarop men de nadruk legt in de beschrijving van Reinke en Berthold. Wollenweber haalt de volgende zin eruit aan: „Man kann diese Dauermycelien Sklerotien nennen, wenn auch

ihre Zellen keinen gröszeren Gewebekörper bilden, wie es bei den gewöhnlich als Sklerotien bezeichneten Bildungen de Fall ist". Bovendien spreken de teekeningen ook voor zijn opvatting. De opvatting van Klebahn en Van der Meer vindt steun in een andere zin: „Das Auftreten von Längswänden wurde hierbei nie beobachtet; die braunen Zellhaufen bilden sich also nur durch das Aneinanderlegen benachbarter Zellfäden." En al is de figuur, die ze geven op plaat 9 fig. 2 misschien niet duidelijk in overeenstemming met deze zin, geheel onmogelijk maakt ze deze beschrijving toch ook niet. Wollenweber zegt van hun afbeeldingen het volgende: „Und wenn Reinke und Berthold sagen, dasz sich diese Sklerotien nur durch Aneinanderlagerung von Hyphen bilden, so zeigen doch ihre Abbildungen, dasz einzelne Hyphen sich gabeln und dadurch Doppelketten entstehen. Von letzteren zu gröszeren Sklerotialen Gebilde ist aber nur ein Schritt".

Deze eene stap is het echter juist, die maakte, dat Klebahn en Van der Meer de schimmel van Reinke en Berthold bij de tweede groep indeelen, en de schimmels der eerste groep V. dahliae noemen.

Het lijkt me thans niet meer mogelijk om met zekerheid uit te maken, tot welke groep de schimmel van Reinke en Berthold behoord heeft, en het is dus van weinig belang aan welke zijde men zich schaart in dezen taxonomischen strijd.

Practisch is de oplossing van Wollenweber waarschijnlijk wel de beste, omdat daarbij alle vormen vallen onder de naam V. alboatrum, en in de litteratuur heel vaak deze naam is gebruikt zoowel voor de eerste als voor de tweede groep, terwijl, als we een soortsonderscheid maken tusschen beide groepen, dan vaak V. Dahliae genoemd wordt V. alboatrum.

Zijn beide groepen gewoonlijk dus goed van elkaar te onderscheiden, moeilijker wordt deze onderscheiding, als we met stammen te doen hebben, die in cultuur kleurloos blijven. Wollenweber deelt ze als vanzelfsprekend in bij de variëteit caespitosum, omdat ze natuurlijk nooit microsclerotien maken.

Eigen onderzoek

Behalve de stammen, die in het Centraalbureau voor Schimmelcul-

tures te Baarn aanwezig waren, heb ik nog een aantal isolaties gemaakt, en het bleek nooit twijfelachtig te zijn tot welke van de beide groepen de schimmel behoorde, zoodat een duidelijk onderscheid tusschen beide groepen wel te handhaven is. Behalve in sclerotienvorming verschillen de groepen namelijk ook nog in enkele andere opzichten. Als we alleen afgaan op de sclerotien, dan zullen er ongetwijfeld zich telkens twijfelachtige vormen voordoen, daar beide vormen overgangen vertoonen tot ongekleurde schimmels, die geen sclerotien vormen. Ik kon echter constateeren dat schimmels uit de eerste groep (Dahliae-groep) zich op vloeibare voedingsbodems, zooals bijv. Richards oplossing, uitsluitend over de oppervlakte der culturen ontwikkelen, zoodat de cultuurvloeistof helder en de schimmel van boven droog blijft, terwijl de schimmels uit de tweede groep zich door de geheele culture heen ontwikkelen, en pas in oude cultures enkele droge plekken aan de oppervlakte vertoonen, en de cultuurvloeistof doortrokken blijft van schimmeldraden.

Wollenweber deelt de kleurlooze van V. alboatrum zonder aarzelen in bij de tweede groep omdat ze geen sclerotien vormen. Daar echter, zooals we reeds besproken hebben, beide groepen overgangen vertoonen naar de kleurlooze vorm, ligt het voor de hand dat kleurlooze stammen evengoed tot de eerste als tot de tweede groep kunnen behooren. De groei op Richard's oplossing kan nu uitwijzen met welke schimmel we te doen hebben.

Het bleek me ook mogelijk te zijn om een stam uit de eerste groep over te voeren in een kleurlooze vorm door bij het overenten telkens zorg te dragen, dat slechts een weinig luchtmycelium op de nieuwe voedingsbodem overgebracht werd. Na elke overent werden er dan minder sclerotien gevormd dan bij de vorige culture en tenslotte werd een vorm verkregen, die totaal kleurloos bleef in reinculture op kersagar en op havermoutagar. Aan pathogeniteit had deze stam niets of slechts zeer weinig ingeboet.

Daar de variabiliteit van Verticillium alboatrum zoo groot is, volgt hieronder een korte geschrijving van de verschillende stammen, die bij dit onderzoek gebruikt zijn.

Stam 1. Geïsoleerd in 1929 uit tomaat. Vormt na drie of vier dagen al microsclerotien, en maakt daarvan een zwart

stroma, terwijl de hyphen ertusschen ongekleurd blijven. Er ontstaat vrij veel luchtmycelium, dat zuiver wit blijft, en het zwarte stroma voor een groot deel bedekt. De conidiëndragers zijn niet zeer talrijk en dragen de conidiën in kleine slijmkopjes, waarin zelden meer dan tien sporen tegelijk bij elkaar zijn.

Stam 2. Geïsoleerd in 1929 uit Syringa. Deze stam komt in de meeste opzichten overeen met stam 1, maar maakt slechts weinig luchtmycelium, dat ook niet wit is, maar grijsachtig. Ook ontstaan hier meer conidiën, al blijven de slijmkopjes nog altijd vrij klein.

Stam 3. Geïsoleerd in 1929 uit Ribes. Deze stam is geheel gelijk aan de vorige.

Stam 4. Geïsoleerd uit Rhus in 1929. Deze stam maakt veel helder wit luchtmycelium, en begint pas na meer dan een week enkele microsclerotien te vormen, die nooit zoo talrijk worden, dat ze overgaan in een dicht zwart stroma. De sporenkopjes zijn weer iets grooter en talrijker dan bij de vorige stam.

Stam 5a. Geïsoleerd door Karthaus uit framboos in 1925. Lijkt in alle opzichten op stam 1, doch is door herhaald overenten van zwart stroma zoo geworden, dat er veel minder luchtmycelium gemaakt wordt.

Stam 5b. Is dezelfde stam als 5a, doch heeft door herhaald overenten van uitsluitend luchtmycelium het vermogen om sclerotien te vormen verloren.

Stam 6. Geïsoleerd in 1929 uit tomaat. Microsclerotien worden nooit gemaakt. Wel ontstaan in oudere culturen onregelmatig snoervormige draden van opgezwolen donkere cellen, die soms in een kluwentje door elkaar heen liggen, en zoo een lichaampje vormen, dat misschien ook wel met de naam microsclerotien aangeduid kan worden, maar dat op geheel andere wijze ontstaan is. De hyphen verschillen zeer sterk in dikte, en de dikste hyphen zijn het donkerste gekleurd. Luchtmycelium wordt weinig gemaakt en is grijsachtig. Over de ge-

heele culture, tot aan de jongste hyphen toe zijn talrijke conidiëndragers met zeer veel conidiën, die soms slijmkopjes vormen waarin honderden conidiën bij elkaar liggen, en die dan met het bloote oog duidelijk zichtbaar zijn.

Stam 7. Geïsoleerd in 1929 uit tomaat. Deze stam lijkt in de meeste opzichten op de vorige, maar verschilt ervan doordat de hyphen zich veel minder snel en sterk kleuren.

De stammen 1 tot 5 behooren dus duidelijk tot de eerste groep, terwijl de stammen 6 en 7 tot de tweede groep behooren.

§ 2. Fusarium-ziekte van Chineesche asters

a. Verschijnselen

Bij de struisveerasters en enkele asters, die als zaaiplanten gekweekt worden, (niet te verwarren met de „vaste asters",) treedt een verwelkingsziekte op, die de planten aantast in alle stadia van ontwikkeling. Het karakter dezer ziekte is over het algemeen veel heftiger, dan dat van de verwelkingsziekte van tomaten door Verticillium of door Fusarium veroorzaakt. Een herstellen van reeds aangetaste planten heb ik nergens kunnen waarnemen; steeds eindigde de infectie met een min of meer snel afsterven der geïnfecteerde planten, zoowel bij hoogere als bij lagere temperaturen.

De infectie verloopt gewoonlijk als volgt. Een dag of tien na de infectiedatum beginnen de onderste bladeren te verwelken, en eenige dagen later hangen al de hoogere bladeren ook slap. De stengel blijft gewoonlijk rechtopstaan en verdroogt. Als de omgeving vochtig genoeg gehouden wordt, bedekt de stengel zich met een dun laagje mycelium, dat talrijke microconidiën draagt. Beach (8) heeft in 1918 deze schimmel geïsoleerd en beschreven als Fusarium conglutinans Wr var. callistephi.

Hij heeft asters ermede geïnfecteerd op een aantal verschillende manieren die het waarschijnlijk maken, dat de infectie geschiedt, doordat de schimmel saprophytisch in de grond leeft en van daar uit door wonden heen de planten infecteert. Door sporen van de schimmel in de grond te brengen, waarin asters groeien, verkreeg

hij een infectie van 24 %, door ook nog de wortels van de asters te kwetsen steeg dit getal tot 43 %.

Deze percentages zijn zeer laag in vergelijking met die, welke optraden bij de infecties, die voor dit onderzoek in Baarn geschiedden, en die bijna zonder uitzondering slaagden, onafhankelijk van de temperatuur. Slechts verliep de verwelking sneller op warmere dagen.

Ook in Europa hebben de Chineesche asters te lijden van een Fusarium-verwelkingsziekte; Prof. W e s t e r d ij k deelde mij mede deze in midden Duitschland sterk verbreid te hebben gevonden; de soort Fusarium is echter niet conglutinans, doch een niet nader bepaalde soort. De stengelbasis van de asters is daarbij sterk rood gekleurd.

b. D e F u n g u s

De Fusarium, die deze asterwerwelking te voorschijn roept, is zoo weinig te onderscheiden van Fusarium conglutinans Wr., dat B e a c h (8) de schimmel beschouwde als een variëteit daarvan, die zich inplaats van op kool, op asters gespecialiseerd heeft. Deze specialisatie is zoo sterk, dat het noch hem, noch J a c k s o n (39) gelukte, om kool ermede te infecteeren. Evenmin gelukte het om met Fusarium conglutinans van kool, verwelkingszieke asters te verkrijgen.

Evenals de meeste Fusariën, die vaatparasieten zijn, behoort ook deze asterfusarium tot de sectie Elegans. Terwijl echter de meeste vertegenwoordigers van deze sectie in staat zijn om in bepaalde omstandigheden een roode of violette kleurstof af te scheiden, mist F. conglutinans dit vermogen, en wordt hoogstens iets geelachtig in oudere cultures.

De stam, die bij deze onderzoekingen gebruikt is, is afkomstig van Jackson, en werd in 1927 in Amerika geïsoleerd. Door de saprophytische levenswijze in reincultuur, is blijkbaar de virulentie in het geheel niet afgenomen.

§ 3. Vergelijking van Fusarium met Verticillium

Bij een vergelijking van het ziekteverloop van Fusariumzieke en

Verticillium-zieke planten, valt de zeer groote overeenkomst sterk in het oog. Meestal zijn de ziekten zonder isolaties niet van elkaar te onderscheiden. Zoowel Verticillium alboatrum als de Fusariën der verwelkingsziekten kunnen uitstekend als saprophyten in de grond blijven leven, van waaruit de infectie op de wortels geschiedt. Bij Verticillium alboatrum vond Van der Meer (46) dat bij het binnendringen van de schimmel in de wortels de celwand der cellen, die doorboord worden, een soort van buisjes vormen als reactie op de hyphen, waardoor deze hyphen als het ware de cel binnengeleid worden. Van deze reactie van planten op andere schimmels kon ik in de litteratuur niets aantreffen.

Nadat bij beide schimmels de hyphen een houtvat bereikt hebben, gaat hierin de ontwikkeling verder en beide veroorzaken een gele of bruine verkleuring van de vaten en daarna een verwelking der aangetaste planten.

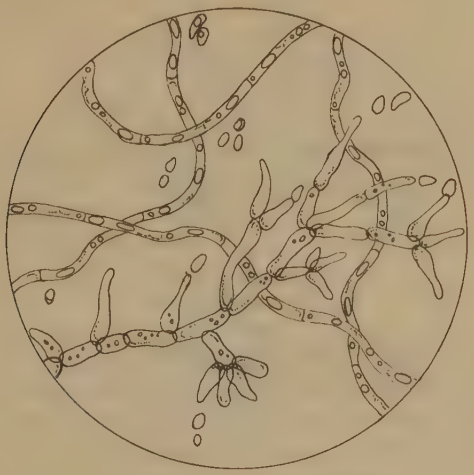
Het ligt dus voor de hand om een groote overeenkomst tusschen de beide schimmelgroepen op physiologisch gebied aan te nemen, een overeenkomst die, wat de voedingsphysiologie betreft, in de volgende hoofdstukken tamelijk te voorschijn treedt.

Ook morphologisch zijn er enkele punten van overeenkomst. Beide geslachten behooren tot de Fungi imperfecti, waardoor het niet goed mogelijk is om de verwantschap nauwkeuriger te bepalen. Hoogere vruchtvormen zijn bij het geslacht Verticillium nog slechts van twee eenigszins afwijkende vormen gevonden, namelijk van V. tubercularioides Speg., en van V. cinnabarinum Pethybridge. Beiden bleken Nectria's te zijn. Daar ook verschillende Fusariumsoorten als imperfecten van Nectria's zijn herkend, wijst dit op een zeker verband tusschen beide geslachten. Echter zijn als perithecienvormen van Fusarien uit de sectie Elegans geen Nectria's gevonden, evenmin als perithecienvormen van Verticillium alboatrum.

Niet alleen langs het geslacht Nectria, maar ook langs het geslacht Cephalosporium zijn de beide geslachten met elkaar verbonden.

Dowson (28) beschreef in 1923 een Cephalosporiumsoort, die een ziekte bij asters veroorzaakt als C. asteris. Nu is aan de eene kant door Westerdijk & van Luyk (67) deze schimmel herkend als een Verticillium, aan de andere kant zijn ver-

schillende Cephalosporiumsoorten herkend als microconidiënvormen van Fusarien, zoodat in het geslacht Cephalosporium zoowel Fusarium als Verticilliumsoorten te vinden zijn.



Figuur 1
Microconidiendrager van Fusarium conglutinans var. callistephi.

Er zijn Fusariumsoorten die niet gauw overgaan tot het vormen van sikkelsporen, en deze vormen microconidiëndragers, die een groote overeenkomst vertoonen met de microconidiëndragers van Verticillium. In fig. 1 vinden we een Fusarium met een conidiëndrager, die, hoewel niet zóó regelmatig als bij V. alboatrum (fig. 2), toch wel eenigszins het Verticilliumtype vertoont.

Het is mijns inziens niet onwaarschijnlijk, dat beide schimmelgeslachten in het systeem dicht bij elkaar staan, hoewel toch ook Verticillium alboatrum in enkele eigenschappen duidelijk van Fusarium verschilt. Een typisch verschil is dat beide variëteiten van V. alboatrum op talrijke verschillende plantensoorten voorkomen, terwijl elke plantensoort met een verwelkingsziekte, door Fusa-

rium veroorzaakt, een aparte soort heeft, die waarschijnlijk geen andere planten aantast. In de volgende hoofdstukken zullen nog enkele andere verschillen te voorschijn komen.

Figuur 2
Microconidiendrager van Verticillium alboatrum Stam 2 met chlamydosporen en een begin van microsclerotienvorming.

HOOFDSTUK III

VOEDINGSPHYSIOLOGIE DER SCHIMMELS IN REINCULTUUR

§ 1. *Methodiek*

Hoewel gewoonlijk voor reincultures van schimmels op vloeibare voedingsbodems kolven gebruikt worden, zijn bij dit onderzoek steeds Petrischalen genomen. Deze bleken namelijk enkele voordeelen boven kolven te hebben. In de eerste plaats gaat het schimmeldek van een goed uitgegroeide schimmelculture moeilijk door de hals van een kolf; dan bleek ook nog dat het drooggewicht, dat bereikt wordt, afhankelijk is van het oppervlak der culture. In een Erlemeyerkolf van 100 c.c. met bodemoppervlak van ongeveer 4 c.M. en in een Petrischaal van 10 c.M. middellijn werden op 25 c.c. voedingsvloeistof Verticilliumsporen van stam 1 gebracht en ná een week bleek het drooggewicht der schimmel in de kolf 120 m.g. en in de Petrischaal 325 m.g. bereikt te hebben; sporen van stam 6 vormde in de kolf 150 m.g. en in de schaal 490 m.g. Om dus een gelijke ontwikkeling in Erlemeyers en in Petrischalen te krijgen, zouden we Erlemeyers van 500 c.c. moeten gebruiken, waarvan het bodemoppervlak gelijk is aan dat van Petrischalen, en deze zouden in een thermostaat zeer veel plaats innemen.

De kans op verontreiniging is in Petrischalen wel grooter, doch bij zorgvuldige behandeling treedt het toch slechts heel zelden op.

Voor het samenstellen der krommen werden telkens een aantal schalen gevuld met 25 c.c. van een voedingsbodem, meestal een

modificatie van Richard's oplossing, door middel van een steriele pipet er in gebracht.

Daarna werd op dezelfde wijze in elke schaal een halve c.c. van een sporenemulsie van de te onderzoeken schimmel gedruppeld. Voor het bereiden van de sporenemulsie van Verticillium werd telkens een culture van de schimmel in een reageerbuis met kersagar van twee weken oud overgoten met 10 c.c. steriel water en hiermede even geschud, waarbij de talrijke sporen een lichte troebeling in het water veroorzaken. Verticillium maakt de conidiën in slijmkopjes, waarvan het slijm dadelijk in water vervloeit, zoodat het overgieten met water alleen al voldoende is, om de sporen in emulsie te verkrijgen. Om een Fusariumsporenemulsie te krijgen werden deze schimmels geënt op lupinenstengels in reageerbuizen en na drie weken overgoten met 10 c.c. steriel water en goed geschud.

Na het enten werden de schalen in een thermostaat op 24 gr. gehouden tot zij op zuurgraad en drooggewicht onderzocht moesten worden. Dan werden de schimmels afgefiltreerd, gedroogd aan de lucht bij ongeveer 60 gr. gedurende 24 uur en daarna gewogen. Van de afgefiltreerde voedingsbodem werd de zuurgraad colorimetrisch bepaald volgens W. Mansfield Clark.

Om eenigszins een idee te krijgen omtrent de nauwkeurigheid der tabellen en krommen, heb ik een aantal cultures op gelijken tijd afgefiltreerd, gewogen en de pH ervan bepaald.

18 Schalen met 25 c.c. Richards-oplossing [1]) werden met schimmelsporen geënt, en wel 6 schalen met Fusarium conglutinans var. Callistephi, 6 schalen met Verticillium alboatrum stam 1, en 6 schalen met Verticillium alboatrum stam 6. Alles kwam in een thermostaat te staan bij 24 graden.

Na zes dagen werd van elke reeks drie schalen nagekeken.

F. conglutinans var. callistephi had

pH	en drooggewichten	
4,5		40 m.g.
4,5		50
4,7		50

[1]) Richards oplossing:
10 G. KNO_3 5 G. KH_2PO_4, 2,5 G. $MgSO_4$. 20 mg. $FeCl_3$, 50 G. glucose op 1 L. water.

V. alboatrum stam 1 had	pH	5,9	en drooggewichten	60
		6,0		60
		6,0		50
V. alboatrum stam 6 had	pH	5,5	en drooggewichten	90
		5,5		80
		5,5		80

Na twaalf dagen werden de overgebleven schalen nagekeken.

F. conglutinans var. callistephi had

	pH	7,1	en drooggewichten	230 m.g.
		7,2		210

derde schaal verontreinigd

V. alboatrum stam 1 had	pH	5,8	en drooggewichten	170
		5,6		155
		5,8		170
V. alboatrum stam 6 had	pH	6,4	en drooggewichten	225
		6,3		230
		6,3		210

De pH's zijn dus ongeveer op 0,2 eenheden nauwkeurig, en de drooggewichten onder de 100 m.g. op 15, onder de 200 m.g. op 25 en onder de 300 m.g. tot op ongeveer 30 m.g. nauwkeurig.

§ 2. *Verticillium alboatrum Rke & Berthold*

a. Invloed van koolhydraten

Verticillium alboatrum is een schimmel, die sterk onder de invloed bleek te staan van de voedingsbodem, en in dit hoofdstuk zullen we enkele van de factoren, die de verandering in habitus veroorzaken, wat nader beschouwen.

De ontwikkeling op kersagar, zullen we als de normale beschouwen, daar hierop de elementen als pigment, microsclerotien, conidiën en luchtmycelium allen rijkelijk gevormd worden. Op havermoutagar is de ontwikkeling ongeveer dezelfde als op kersagar. Beide bodems zijn samengesteld uit de meest ingewikkelde en verschillende bestanddeelen, en bevatten zoowel eiwitten als koolhydraten. Kweeken we de schimmel op eenvoudiger bodems, dan zullen de invloeden van de verschillende bestanddeelen meer en meer te voorschijn treden.

Op peptonbodems, waarin geen koolhydraten zijn gebracht, groeien de schimmels uit beide groepen goed, maar zien er heel anders uit, daar, terwijl gewoonlijk de meeste stammen in reincultuur totaal zwart worden, op pepton geen pigment gevormd kan worden, zoodat alle stammen helder wit blijven. Er ontstaat over het algemeen meer luchtmycelium en de hoeveelheid conidiën, die de schimmels maken schijnt niet veranderd te zijn. Microsclerotien ontstaan nooit. Op andere eiwitbodems is de ontwikkeling een dergelijke, zooals bijv. bouillongelatine. De gelatine vervloeit hier langzaam.

Het onderscheid tusschen de beide groepen van Verticillium alboatrum is door deze invloeden op eiwitbodems veel moeilijker geworden, daar noch microsclerotien, noch het donkere pigment ontstaat, terwijl dit juist de voornaamste verschilkenmerken zijn.

Zoodra we in een eiwitbodem een verteerbaar koolhydraat brengen, dan begint de vorming der zwarte microsclerotien bij groep 1, en de donkerkleuring der hyphen bij groep 2. Deze invloed is afhankelijk van de vorm waarin de koolhydraten toegediend worden, en van de concentratie ervan, en ik heb nader onderzocht, hoe stam 1 als vertegenwoordiger der eerste groep, en stam 6 als vertegenwoordiger der tweede groep zich onder omstandigheden gedragen.

	Concentratie, die na één week kleuring veroorzaakt.	
zetmeel . . .	stam 1: ½ %	stam 6: 1 % 24 gr.
saccharose . . .	1 %	4 %
gummi arabicum .	1 %	4 %
maltose	1 %	4 %
glucose	2 %	8 %
fructose	2 %	8 %
galactose	2 %	8 %
arabinose . . .	2 %	8 %

De sterkste werking schijnt uit te gaan van zetmeel, daar dit in concentratie van ½ % na een week al een donkere kleuring van stam 1, in concentratie van 1 % donker kleuring van stam 2 te voorschijn roept. Daarna volgt rietsuiker en ongeveer gelijk hieraan is de invloed van maltose en arabische gom. Tenslotte vol-

gen de enkelvoudige suikers. Een groot verschil tusschen arabinose en hexosen treedt niet op. De getallen uit de tabel zijn niet als absolute waarden gegeven, daar ook nog een aantal andere factoren een rol spelen bij de pigmentvorming, zooals we spoedig zullen zien. Ook de tijd heeft een belangrijke invloed hierop. Bij lagere percentages dan die uit de tabel, krijgen we vaak na eenige weken pas een kleuring, bij hoogere soms na enkele dagen al. Ook treedt bij lagere temperatuur de kleuring later op, althans wanneer die onder 18 gr. komt.

Stam 7, die op kersagar minder snel pigment maakt, was ook ten opzichte van de koolhydratenconcentratie altijd iets langzamer in zijn pigmentvorming dan stam 6, terwijl stam 5b er in het geheel niet toe gebracht kon worden om zich te kleuren.

Cellulose bleek ongeschikt te zijn voor koolstofbron. Op gelatine vermengd met vezels van filtreerpapier ontwikkelden de schimmels zich op dezelfde wijze als op gelatine alleen. Dit was wel eenigszins te verwachten omdat, waar ze in de natuur voorkomen in de houtvaten van de geïnfecteerde planten, ze de wanden hiervan nooit aantasten; de bruine verkleuring ervan moeten we beschouwen als een reactie van het plantenweefsel op schadelijke stofwisselingsproducten van de schimmels. Deze moeten zich dus voeden met de zouten en suikers, die door de waterbanen omhoog gevoerd worden.

b. De invloed van den zuurgraad

Als de conidiën van Verticillium alboatrum uitgezaaid worden op voedingsoplossingen met verschillende pH, dan is een van de meest opvallende dingen de groote verschillen in habitus van de verschillende cultures. Behalve op de groei der schimmels heeft de waterstofionenconcentratie dus ook een groote invloed op de vorming van de verschillende elementen. Bij Aspergillus niger is een dergelijke invloed ook gevonden, doch nergens zag ik haar meer systematisch uitgewerkt. Ritter (53) vond, dat de reuzencellen der Aspergillaceen vooral onder invloed van de groote zuurgraad ontstonden. Sternberg (65) vermeldt dat Aspergillus niger in zure cultures dikkere en meer ondoorschijnende hyphen maakt, dan in meer alcalische. Volgens Boas (17) wordt de conidiënvorming vertraagd door de waterstofionenconcentratie.

Om een beeld te krijgen van de ontwikkeling van Verticillium bij verschillende zuurgraad, heb ik een aantal schalen met Richards oplossing, waaraan nog ½ % K_2HPO_4 toegevoegd was om een grootere buffercapaciteit te verkrijgen, geënt met conidiën van stam 1 en stam 6. Met KOH of H_2SO_4 werden de schalen op de gewenschte zuurgraad gebracht.

Na 8 dagen had stam 1 zich op de volgende wijzen ontwikkeld:

pH 9 Geen ontwikkeling.

pH 8 Vrij slechte groei. De cellen zijn erg gezwollen en onregelmatig. De culture blijft nat van boven, en kleurt zich niet (fig. 3).

pH 7 Goede ontwikkeling. De bovenzijde is droog, en een zeer dun laagje luchtmycelium bedekt het donkere stroma. Hierin zijn echter haast geen normale microsclerotien, doch bijna uitsluitend lange reeksen van donkere opgezwollen cellen, die zoo goed als geen laterale deelingen vertoonen (fig. 4). Conidiën treden niet talrijk op.

pH 6 Goede ontwikkeling. De bovenzijde vertoont meer luchtmycelium, dan de vorige culture, en in het stroma hebben zich zeer talrijke normale microsclerotien ontwikkeld, die de geheele culture donker maken. De conidiën ontwikkelen zich in groot aantal (fig. 5).

pH 5 De ontwikkeling is nog steeds goed, doch de pigmenteering treedt bij deze zuurgraad niet meer op. Er ontstaan geen microsclerotien, veel luchtmycelium en zeer veel conidiën.

pH 4 De ontwikkeling is hier veel minder goed dan bij de vorige culture. Er is geen pigmentvorming. De culture blijft onder de oppervlakte, en er ontstaan geen conidiën. Er treden echter veel chlamydosporen op (fig. 7). De schimmel heeft de voedingsoplossing zeer slijmerig gemaakt, zoodat het filtreeren van deze culture haast onmogelijk wordt.

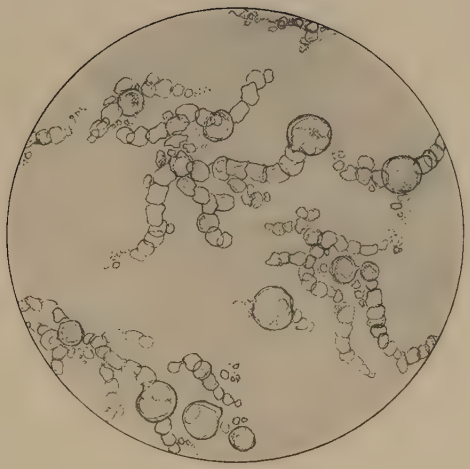
pH 3 Geen ontwikkeling.

Stam 6 werd op ongeveer dezelfde wijze door de pH beïnvloed.

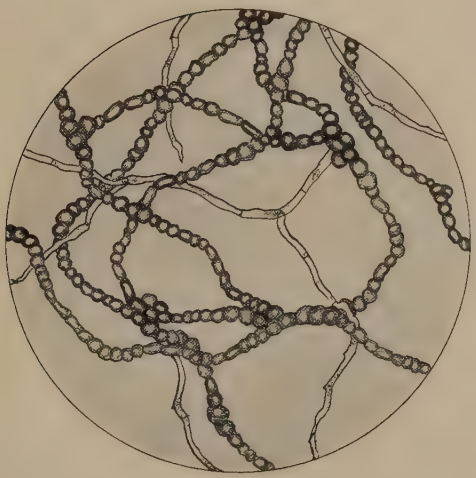
pH 9 Geen ontwikkeling.

pH 8 Vrij slechte groei. De culture blijft kleurloos, en lijkt in alle opzichten op stam 1 bij deze zuurgraad.

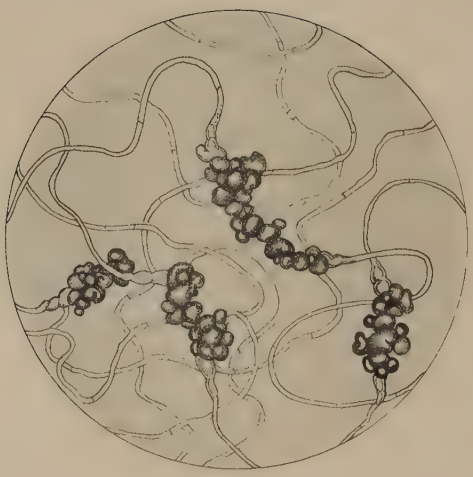
pH 7 De groei is goed, de bovenzijde der culture blijft nat, en



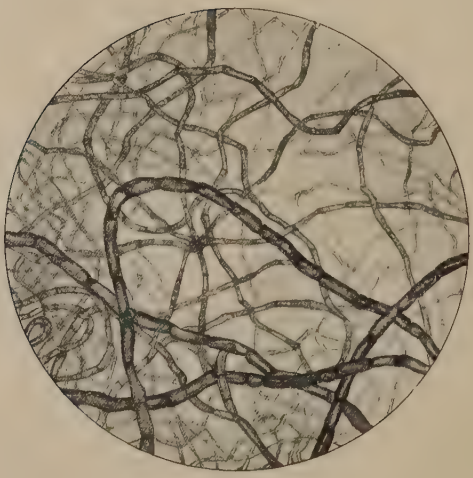
Figuur 3
Verticillium alboatrum
Stam 1, bij pH 8.



Figuur 4
Verticillium alboatrum
Stam 1, bij pH 7.



Figuur 5
Verticillium alboatrum
Stam 1, bij pH 6.

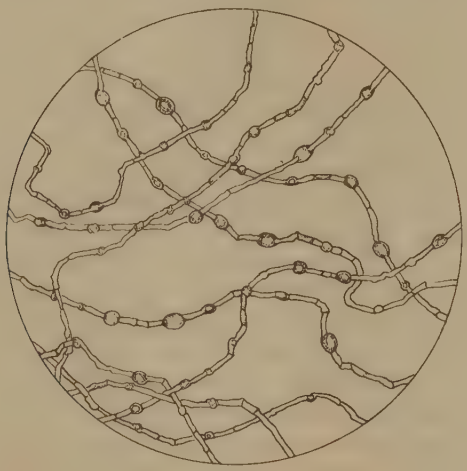


Figuur 6
Verticillium alboatrum
Stam 6, bij pH 6.

er ontstaan slechts enkele plekken, waar de donkere kleurstof zich ontwikkelt. Dit pigment zit in breede hyphen, die nergens opgezwollen cellen vertoonen, zooals bij stam 1. Veel conidiën (fig. 6).

pH 6 Gelijk aan de vorige, alleen zijn hier nog meer conidiën gevormd.

pH 5 Gelijk aan de vorige, doch hier geen pigmentvorming.



Figuur 7
Verticillium alboatrum
Stam 1, bij pH 4

pH 4 Groei vrij slecht. Mycelium ongekleurd met enkele chlamydosporen. Er worden nog enkele conidiën gevormd. Sterke slijmafscheiding.

pH 3 Geen ontwikkeling.

De vorming van het pigment schijnt dus gebonden aan een zuurgraad tusschen pH 8 en 5, en is tusschen 6 en 7 het sterkst, dus dicht bij het neutrale punt. De beste zuurgraad voor de ontwikkeling der conidiën, ligt tusschen pH 5 en 6, terwijl alleen in die cultures, waar de H-ionenconcentratie schadelijk begint te werken op de groei der schimmel, chlamydosporen gaan optreden.

Als we de drooggewichten van deze beide reeksen nagaan, dan blijken de cultures van pH 5, 6 en 7 ongeveer hetzelfde gewicht te hebben.

pH	stam 1 drgg.	stam 6 drgg.	
8	40	55	m.g.
7	145	120	
6	150	120	
5	140	105	
4	75	60	

Van het optreden van twee maxima, zooals verscheidene auteurs voor verschillende schimmels vermelden, blijkt niets. Het optreden van deze maxima gescheiden door een minimum, schijnt trouwens van allerlei nog onbekende factoren afhankelijk te zijn; White (68) onderzocht verscheidene stammen van Fusarium Lycopersici, en vond bij verschillende stammen de tweetoppigheid niet, terwijl bij de stammen waar dit wel optrad, deze toppen niet altijd op dezelfde punten lagen. Soms was bij pH 6 een maximum, soms echter ook juist een minimum. Bovendien schijnt ook de temperatuur een groote invloed op het al of niet optreden van de tweetoppigheid te hebben. Zoo vond Tamiya (66) bij Aspergilles oryzae een uitgesproken twee toppigheid bij 30 gr. C., terwijl dit niet optrad in de onderzoekingen van Wiersma (mondelinge mededeeling), die zijn cultures zich bij 22 gr. C. liet ontwikkelen. De veronderstelling van Robbins (55) om het minimum tusschen beide toppen in verband te brengen met het isoelectrische punt van het protoplasma, lijkt me daarom vrij voorbarig, vooral daar het protoplasma uit zeer veel verschillende colloiden bestaat, waarvan het isoelectrische punt ook wel op verschillende plaatsen zal liggen. Robbins grondt zijn veronderstelling erop, dat bij het isoelectrische punt, waar dus de geringste hydratatiegraad optreedt, hierdoor de levensverrichtingen vertraagd zouden zijn.

c. Invloed van mineralen

Om den invloed na te gaan, die verschillende voedingszouten hebben op de ontwikkeling van Verticillium, is een synthetische voedingsbodem noodzakelijk en bleek Richards oplossing uitstekend voor dit doel geschikt, daar de schimmels hierop een goede ontwikkeling vertoonen.

In deze voedingsoplossing is het eerste dat opvalt een typisch verschil in habitus tusschen beide groepen. Brengen we er eenige

druppels van een sporenemulsie van een stam uit de eerste groep in, dan begint na eenige dagen een dun laagje mycelium zich op de oppervlakte te ontwikkelen, dat gedurende de geheele groei droog blijft aan de bovenzijde, terwijl de onderstaande vloeistof helder blijft. Enten we de oplossing echter met een sporenemulsie van een schimmel uit de tweede groep, dan ontwikkelt zich de schimmel van de bodem af omhoog, of van de oppervlakte naar beneden, zoodat na eenigen tijd de cultuurvloeistof geheel doorgroeid is met mycelium. De oppervlakte blijft de eerste tijd nat en pas later ontstaan er droge plekken op. Deze Richards-oplossing is dus een goede voedingsbodem om de beide groepen te onderscheiden, ook al hebben ze het vermogen tot sclerotienvorming verloren.

Door uit deze oplossing telkens een van de zouten weg te laten, zal de invloed, die dat zout op de functies der normale ontwikkeling heeft, te voorschijn treden in het veranderen of wegblijven van een of enkele van deze functies.

Beginnen wij met het $FeCl_2$ uit de oplossing weg te laten, dan blijkt dat dit niet de minste invloed heeft op de ontwikkeling der schimmels. Als ijzer noodzakelijk is voor de groei, dan is de kleine hoeveelheid ervan, die meekomt met de entvloeistof of als verontreiniging zit in de gebruikte zouten, reeds voldoende.

Laten we $MgSO_4$ weg dan ontstaat er wel een groote verandering. Wat het drooggewicht betreft ontwikkelt zich de schimmel ongeveer even sterk als normaal, doch steeds blijven alle cultures totaal wit. Dit zout is dus evenals koolhydraten noodzakelijk voor de pigmentvorming. Bij schimmels uit de eerste groep worden wel de sclerotien aangelegd, doch ze brengen het nooit verder dan het jongste stadium van een reeks opgezwollen ongekleurde cellen, zonder laterale wanden.

Daar in dit geval de schimmels zoowel aan magnesium als aan zwavel gebrek hebben, heb ik verschillende cultures magnesium gegeven als $MgCO_3$, andere zwavel als K_2SO_4. Uit deze cultures bleek, dat het magnesiumgebrek verantwoordelijk was voor het wegblijven van de kleurstof. De cultures met $MgCO_3$ werden donker, die met K_2SO_4 bleven wit. Een dergelijke invloed van het magnesium op de pigmenteering komt herhaaldelijk voor, zoowel bij schimmels als bij bacteriën. Zoo wordt Monascus purpureus

bij Mg gebrek niet purper (Hibino, 34). Gorbach vermeldt in 1929 (31) dat Bacillus prodigiosus, die onder normale omstandigheden een helderroode kleurstof maakt, bij gebrek aan magnesium ongekleurd blijft.

Behalve dit wegblijven van de pigmentvorming, vertoonden de cultures met magnesiumgebrek ook nog een ander verschil met de normale. In de meeste hyphen, de dikste uitgezonderd, waren talrijke oliedruppeltjes ontstaan, van ongelijke afmeting en op ongelijke afstanden van elkaar.

Op de conidiënvorming heeft magnesium blijkbaar geen invloed. In alle cultures traden conidiën rijkelijk op.

In de cultures met zwavelgebrek bleek nog een vrij goede ontwikkeling plaats te vinden. Ook hier waren de drooggewichten niet veel minder dan de normale. De vorming van de sclerotien had hier op de gewone wijze plaats en de hyphen vertoonden ook niet veel meer oliedruppels dan gewoonlijk. Een verschil met de normale ontwikkeling was hier gelegen in de conidiënvorming, die heel sterk verminderd bleek te zijn. Pas oudere cultures begonnen enkele conidiën te maken, terwijl deze in normale cultuurvloeistof al na enkele dagen in groote getale van de conidiëndragers afgescheiden worden.

Geven we geen KH_2PO_4, dan is de cultuurvloeistof niet gebufferd, en zou de zuurgraadverschuiving al dadelijk een groote rol gaan spelen. Doch het bleek dat, bij de combinatie van zouten, zooals die in de Richards-oplossing voorkomen, de schimmels zelf de vloeistof in de buurt van het neutrale punt handhaafden. Waren magnesium en zwavel slechts in geringe hoeveelheden noodig om een goede groei te veroorzaken, dit is niet het geval met het element phosphor. Alle cultures, waarbij de concentratie van het KH_2PO_4 minder was dan $\frac{1}{4}$ %, ontwikkelden zich duidelijk minder dan de cultures op de normale oplossing. Bij de cultures met heel weinig phosphor sprong het verschil tusschen schimmels uit de twee verschillende groepen wederom duidelijk in het oog. Vertegenwoordigers van groep 1 vormden een dun laagje mycelium aan de oppervlakte, waarin kleine zwarte puntjes de sclerotien aanduidden, terwijl stammen uit groep 2 aan de bodem der schalen vastgroeiden en wit bleven. Bij microscopische beschouwing bleken alleen de vertegenwoordigers van groep 2 conidiën te hebben gemaakt,

waarvan bijna de geheele inhoud in beslag werd genomen door twee groote oliedruppels (fig. 8). Beide groepen hadden in de hyphen een groot aantal oliedruppeltjes van precies gelijke grootte en allen op gelijke afstanden van elkaar (fig. 9). We zien hierbij dus een veel regelmatiger beeld dan dat er ontstaan is door gebrek aan zwavel.

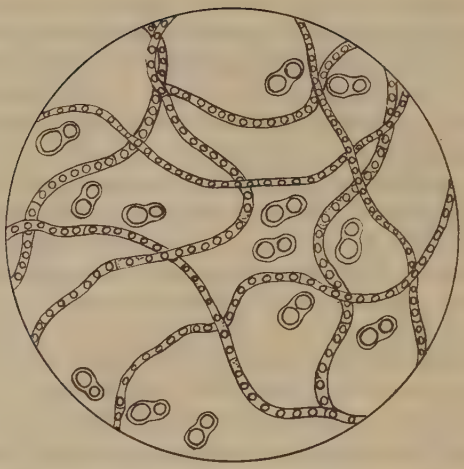
Van het element kalium bleek de geringe hoeveelheid, die uit het glas diffundeerde, of als verontreiniging in de andere zouten zat, reeds voldoende te zijn voor een goede ontwikkeling, daar cultures, waarin alle kalium door natrium vervangen was, niet te onderscheiden waren van de normale cultures.

d. Invloed van de stikstofbron

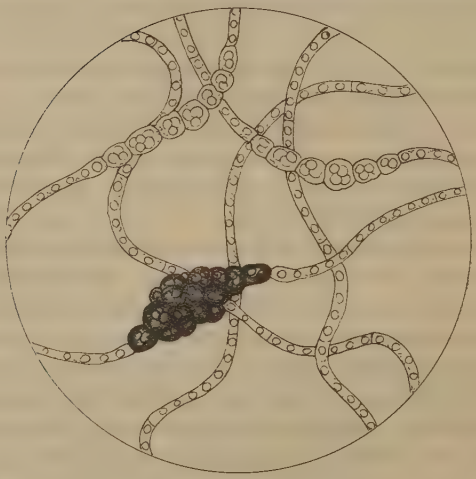
In de eerste plaats hangt het van de verbinding af, die tot stikstofbron voor de schimmel dient, in welke richting de pH verschuiving zal zijn. De verbindingen, die tot stikstofbron kunnen dienen zijn talrijk. Czapek (26) heeft reeds in 1902 uitgebreide onderzoekingen hierover gedaan, en hij kwam daarbij tot de conclusie, dat Aspergillus niger het gemakkelijkste zijn eiwitten opbouwen kon uit aminozuren. Hij verklaarde dit door te veronderstellen, dat de eerste stap tot de eiwitverbindingen was de vorming van aminozuren, en dat deze stap bij aanwezigheid van aminozuren in de voedingsbodem nu niet gedaan behoefde te worden.

Lutz (44) kwam in 1905 tot de slotsom, dat Aspergillus niger het beste aminozuren gebruiken kon, daarop volgden de NH_4-zouten, dan de aminen en ten slotte bleken de nitrilen als stikstofbron bijna onbruikbaar te zijn.

Ritter onderzoekt in 1909 (53) negen verschillende schimmels, die hij in drie verschillende groepen onderscheiden kan naar gelang hun vermogen om stikstof uit ammonium of uit nitraat te verwerken. Aspergillus glaucus, Mucor racemosus en Cladosporium herbarum zijn evengoed in staat om hun stikstof uit ammonium als uit nitraat te halen. Aspergillus niger, Botrytis cinerea en Penicillium sp. kunnen nitraat gebruiken, doch vertoonen een veel betere ontwikkeling op ammoniumbodems. Rhizopus nigricans, Mucor mucedo en Thamnidium elegans weigeren op nitraat te groeien. Czapek (27) vermoedt dat de mogelijkheid om nitraten te verwerken ervan afhangt of de schimmel in staat is om nitraten



Figuur 8
Verticillium alboatrum
Stam 6, bij Phosphorgebrek



Figuur 9
Verticillium alboatrum
Stam 1, bij Phosphorgebrek

tot nitrieten te reduceeren. Dit zou dan weer verder gereduceerd worden tot ammoniak, en zoo in een bruikbare vorm omgezet zijn. Ritter (54) heeft in 1911 aangetoond, dat in verschillende schimmelculturen na eenige dagen nitrieten aantoonbaar waren. Of echter het ammonium, dat later ook in de cultures gevonden wordt, uit deze nitrieten ontstaan is, valt sterk te betwijfelen, daar door autolyse altijd een aanzienlijke hoeveelheid ammoniak vrijkomt.

Hoagland en Davis (36) maken het waarschijnlijk, dat in zuur milieu anionen sneller geabsorbeerd worden dan kationen, terwijl in alcalisch milieu het omgekeerde plaats heeft. Dus zou in een zuur milieu meer nitraat, in een alcalisch milieu meer ammonium worden opgenomen. Zij vinden ook werkelijk bij Nitella, dat tusschen pH 5,0 en 6,2 nitraat veel gemakkelijker opgenomen wordt dan tusschen pH 7,0 tot 9,0. Ook Robbins en Scott komen tot een dergelijke conclusie (56).

Zijn de schimmels op een ammoniumzout als stikstofbron aangewezen, dan komt het zuur, waarvan het zout afgeleid is als zoodanig vrij, en zal de culture een pH-verschuiving naar de zure kant vertoonen. Gebruiken we ammoniumzouten van sterke zuren, dan zal al gauw zoo'n groote zuurgraad bereikt zijn, dat de schimmel zich niet verder ontwikkelen kan. Op zouten van zwakke zuren zal dus ten slotte een betere ontwikkeling plaats vinden dan op zouten van sterke zuren.

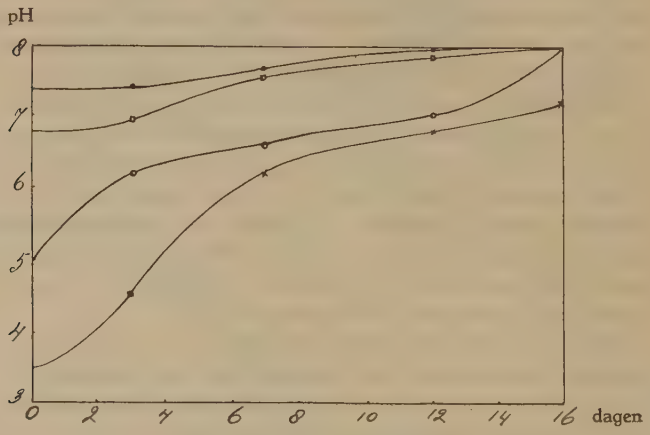
Zijn de schimmels op KNO_3 aangewezen als stikstofbron, dan verschuift de reactie gewoonlijk naar de alcalische kant, hoewel we eerst vaak een kleine toename van de zuurgraad vinden.

Op cultures met ammoniumnitraat zijn dus alleen al door de pH-verschuiving van de voedingsoplossing nitraatschimmels van ammoniakschimmels te onderscheiden. Volgens de onderzoekingen van Klotz (41) is Aspergillus niger een uitgesproken ammoniakschimmel evenals Diplodia natalensis, terwijl Sphaeropsis malorum een nitraatschimmel zou zijn, daar deze de zuurgraad der voedingsbodems met ammoniumnitraat naar de alcalische kant verschuift.

Als we willen nagaan hoe Verticillium reageert op de verschillende stikstofverbindingen, dan kunnen we dit het beste doen door in Richardsoplossing het KNO_3 te vervangen door een andere N-verbinding.

Nemen we eerst de onveranderde Richardsoplossing, waarin dus

alleen KNO_3 beschikbaar is, dan zien we een neiging bij alle cultures, onverschillig de begin-pH om pH 8 te bereiken (fig. 10 en tabel I). Dat de pH-lijnen niet recht naar pH 8 toe loopen wordt in



Figuur 10
Zuurgraadverschuiving van Verticillium alboatrum als KNO_3 als stikstofbron gegeven wordt.

de eerste plaats veroorzaakt doordat de voedingsoplossing tusschen pH 6 en 7 het sterkst gebufferd is. De groeigrens aan de alcalische

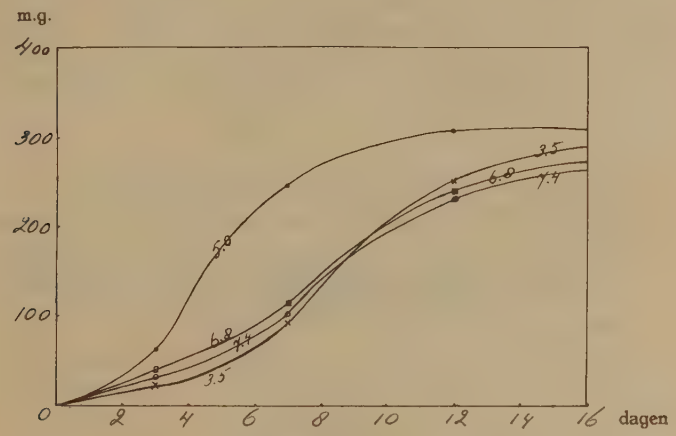
TABEL I

Verticillium op KNO_3

KNO_3	p.H.	drgg.	p.H.	drgg.	p.H.	drgg.	p.H.	drgg.
19/4	3,5	0	5	0	6,8	0	7,4	0
22/4	4,5	35	6,2	65	7,0	60	7,4	45
26/4	6,2	90	6,6	245	7,6	110	7,6	100
1/5	6,6	260	6,8	315	7,8	240	7,8	230
6/5	7,0	295	8,0	310	8,0	280	8,0	260

zijde ligt voor Verticillium bij pH 8,5 en bij pH 8,0 is de groei allang niet meer optimaal, zooals we zagen. Daardoor komt het, dat

de cultures met begin-pH 6,8 en 7,4 een kleiner drooggewicht bereiken dan de cultuur met begin-pH 5, die gedurende het grootste deel van zijn ontwikkeling blijft op het gebied van maximale groei, tusschen pH 5 en 7. De cultuur met de begin-pH 3,5 blijft de eerste tijd ook achter bij zijn voorganger, daar ook deze cultuur moet groeien door een ongunstig gebied voor de groei. Komt deze cultuur later bij gunstiger pH, dan zien we de groei ook sterk versneld worden (fig. 11).



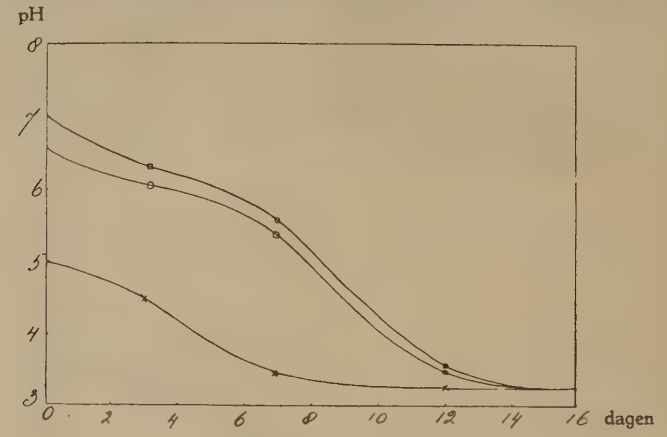
Figuur 11
Drooggewichten van Verticillium alboatrum bij KNO_3 als stikstofbron.

De schimmels uit beide groepen van Verticillium alboatrum bleken ten opzichte van de stikstofverbindingen op volkomen dezelfde wijze te reageeren, zoodat we in dit gedeelte telkens met één beschrijving volstaan kunnen.

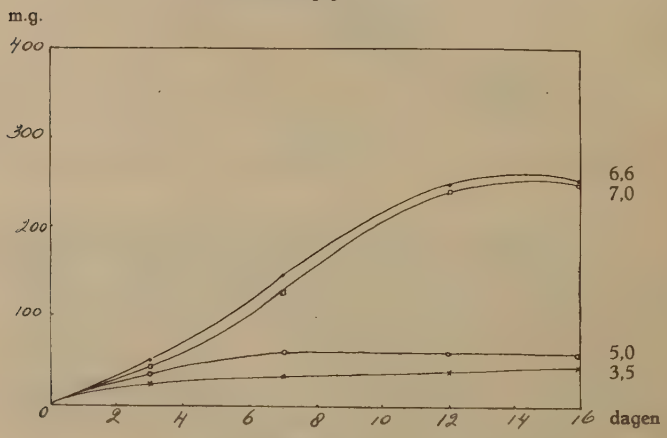
Geven we in de voedingsoplossing inplaats van KNO_3 ammoniumsulfaat, dan wordt de oplossing al gauw zoo zuur, dat de groei ophoudt, waaruit blijkt, dan ammoniumionen uitstekend zijn voor de stikstofopname van de schimmel.

Geven we ammoniumnitraat, dan zien we de zuurgraad even snel toenemen, wat erop wijst dat in dit geval de stikstof vrijwel alleen als ammoniumionen opgenomen wordt, terwijl de nitraationen

onaangeroerd worden gelaten (fig. 12 en 13 en tabel 2). Dit is merkwaardig, daar bij afwezigheid van ammonium, het nitraat zeer



Figuur 12
Zuurgraadverschuiving van Verticillium alboatrum als NH_4 NO_3 als stikstofbron gegeven wordt.



Figuur 13
Drooggewicht van Verticillium alboatrum met NH_4 NO_3 als stikstofbron.

goed gebruikt kan worden. Zelfs bij toevoeging van een zeer geringe hoeveelheid van een ammoniumzout aan een nitraatbodem

bleek het nitraat niet aangeroerd te worden. Een normale Richards-oplossing, waarin dus 1 % KNO_3 aanwezig was, bereikte na korten tijd de onderste groeigrens, toen er 0,02 % ammoniumphosphaat in gebracht was. Hier kon de schimmel niet doorgroeien omdat de nitraatstikstof door de aanwezigheid van ammoniumionen niet bruikbaar was. Het gaat dus zeker niet altijd op, dat in zuur milieu beter anionen, in alcalisch milieu beter kationen geabsorbeerd worden. Dergelijke gevallen, dat de eene stikstofverbinding de andere onbruikbaar maakt, zijn bij enkele andere schimmels ook bekend. Boas en Leberle (18) vonden dat Aspergillus niger goed kan groeien op aceetamide, doch wanneer in een cultuur behalve aceetamide ook nog aanwezig is ammoniumsulfaat, al is dit

TABEL II

Verticillium op NH_4NO_3

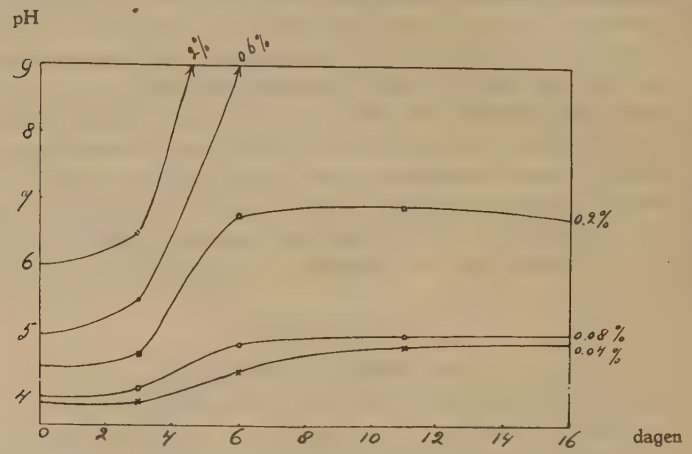
NH_4NO_3	p.H.	drgg.	p.H.	drgg.	p.H.	drgg.	p.H.	drgg.
19/4	3	0	5	0	6,6	0	7,0	0
22/4	3	0	4,4	(30)	6,2	45	6,4	30
26/4	3	0	3,4	(65)	5,6	115	5,6	140
1/5	3	0	3,2	(75)	3,4	240	3,4	220
6/5	3	0	3,2	(70)	3,3	250	3,2	220

er ook slechts in geringe hoeveelheid, dan wordt het aceetamide niet aangetast, doch alleen ammoniumionen gebruikt. Evenmin werd het aceetamide als stikstofbron gebruikt als er glycine aan de oplossing was toegevoegd.

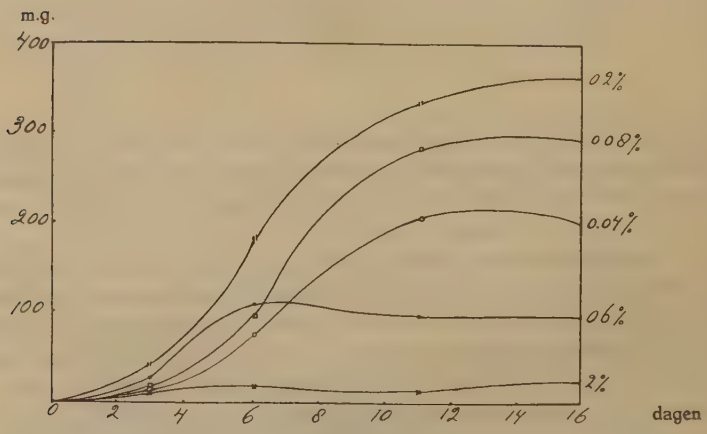
Een buitengewoon goede ontwikkeling vindt plaats als het ammonium zout een zout is van een zwak organisch zuur, dat zelf als koolstofbron dienst kan doen zooals ammoniumlactaat. Dan wordt de voedingsbodem iets zuur, doch daar ook de lactaationen afgebroken worden, wordt de zuurgraad nooit zoo sterk, dat ze schadelijk wordt voor de ontwikkeling van de schimmel.

Geven we ureum als eenige N-bron, dan treden er ook groote pH-verschuivingen op, maar nu weer naar de alcalische kant, en van de ureumconcentratie zal het afhangen, hoever die verschui-

ving zal zijn (fig. 14 en 15 en tabel 3). Verticillium is blijkbaar uitstekend in staat om urease te vormen, dat ureum omzet in am-



Figuur 14
Zuurgraadverschuiving van Verticillium alboatrum met Ureum als stikstofbron.



Figuur 15
Drooggewicht van Verticilium alboatrum met Ureum als stikstofbron.

moniak en CO_2, waardoor de cultuur dan alcalisch wordt. De

werking van dat urease schijnt niet aan een bepaalde pH gebonden te zijn, daar het nog werkzaam was in cultures, die zoo alcalisch waren, dat ze een sterke ammoniaklucht verspreidden. Uit de figuur blijkt dat bij een ureumconcentratie van 0,04 % de schimmel een evenwicht maakt bij pH 4,8; 0,08 % geeft een evenwicht bij pH 5,0; 0,2 % geeft een evenwicht bij pH 6,8, terwijl concentraties van 0,6 % en meer de cultures zoo alcalisch maken, dat de schimmel niet meer groeit, of zelfs dood gaat.

Op een voedingsbodem zonder ureum wordt geen urease ge-

TABEL III

Ureumreeks van Verticillium alboatrum stam 6

Ureum		11/6	14 6		17/6		22/6		28/6	
		p.H.	drgg.	p.H.	drgg.	p.H.	drgg.	p.H.	drgg.	p.H.
0,1 cc	0,04 %	3,8	10	3,7	75	4,4	210	4,8	210	4,8
0,2 cc	0,08 %	4,1	15	4,1	100	4,8	280	4,8	290	5,0
0,5 cc	0,2 %	4,5	30	4,6	180	6,8	340	6,8	360	6,7
1,5 cc	0,6 %	5,0	—	5,5	120	9,0	110	9,0	100	9,0
5 cc	2 %	6,0	—	6,5	0	9,0	0	9,0	0	9,0

vormd, zooals blijkt uit het volgende: 10 c.c. filtraat van een Verticilliumculture op gewone Richardsoplossing gaf gedurende 48 uren met 10 c.c. 1 % ureumoplossing geen ammoniakvorming.

Als we de groei vergelijken op nitraat, ammonium en asparagine in gelijke N-concentraties, dan komen we tot de volgende cijfers:

nitraat	pH van 6,6 tot 7,0	drooggewicht	40 m.g.
ammonium	pH van 6,6 tot 6,0	,,	110 m.g.
asparagine	pH van 6,6 tot 6,4	,,	100 m.g.

Verticillium blijkt dus een schimmel te zijn, die groeit op nitraatbodems, doch een betere ontwikkeling vertoont op bodems, waarin ammonium in een of andere vorm voorkomt. Ook asparagine is een uitstekende stikstofbron, doch niet beter dan ammonium, zooals Czapek voor Aspergillus niger vond.

§ 3. *Fusarium conglutinans Wr. var. callistephi Beach, Fusarium Lycopersici Sacc. Fusarium vasinfectum Atk. Fusarium oxysporium Schlecht.*

a. De invloed van koolhydraten

Hoewel uit het geslacht Fusarium verscheidene soorten gekenmerkt zijn door de een of andere heldere kleurstof, die vaak in reinculturen gevormd wordt, zien we toch in de meeste gevallen, dat die kleurstof alleen optreedt op enkele bepaalde voedingsbodems, terwijl op andere bodems, waar de schimmels toch wel een uitstekende ontwikkeling op vertoonen, de kleur geheel achterwege blijft. De vier hier onderzochte schimmels behooren allen tot de sectie Elegans van het geslacht Fusarium, een sectie, waarvan de meeste soorten (o.a. F. Lycopersici, F. vasinfectum en F. oxysporium) als ze op rijst gekweekt worden, een intens roode kleurstof produceeren, terwijl enkele andere soorten (o.a. F. conglutinans) hierop kleurloos blijven of een licht gele of oranje tint aannemen. Op lupinestengel gekweekt, zag ik noch bij de kleurvormende, noch bij de kleurlooze soorten een kleurstof optreden; de schimmeldraden bleven hier steeds geheel wit.

Uit het feit, dat slechts op enkele bodems de roode kleurstof ontstaat, blijkt al dadelijk een belangrijke invloed van de voedingsbodem op de habitus van de schimmel, en in de eerste plaats op de pigmentvorming. Bij Verticillium alboatrum is gebleken, dat voor de pigmenteering allereerst een goed verteerbaar koolhydraat noodzakelijk is. We zullen nu nagaan of dit ook een factor is voor de pigmentvorming van Fusarium.

Kweeken we een der drie kleurstofvormende Fusariën op een peptonbodem, dan blijven ze totaal kleurloos, hoewel ze zich er overigens goed op ontwikkelen. Voegen we aan deze peptonbodem een koolhydraat toe, bijv. glucose of zetmeel, dan blijven de cultures over het algemeen nog altijd ongekleurd. Daar bij Verticillium behalve de aanwezigheid van koolhydraten, ook nog de zuurgraad een belangrijke rol speelt, en de rijstcultures, waarop de Fusariumsoorten het meeste pigment produceeren, altijd tamelijk zuur zijn, lag het voor de hand om de peptoncultures met zetmeel erin door middel van zwavelzuur iets aan te zuren. Nu begonnen enkele dagen later reeds de meeste cultures een duidelijke roode

kleur te vertoonen. Aangezuurde peptoncultures zonder koolhydraat bleven kleurloos, zoodat dus bij deze Fusariumsoorten evenals bij Verticillium alboatrum, de pigmenteering afhankelijk is zoowel van de aanwezigheid van koolhydraten als van een bepaalde zuurgraad.

Of de verschillende koolhydraten nog verschillend inwerken op de kleurstofvorming, kon ik niet nagaan, daar slechts over een zeer beperkt gebied der zuurgraad de kleurstof gevormd wordt, zooals we in de volgende paragraaf zullen zien, en het me niet mogelijk was om de cultures gedurende voldoende tijd binnen de grenzen van dat gebied te houden. Wel kon ik constateeren, dat alle op pag. 20 genoemde koolhydraten in staat zijn om de kleurstof te voorschijn te roepen.

b. De invloed van de zuurgraad

In Richards oplossing ontwikkelen de onderzochte Fusariën zich uitstekend, en ze groeien door de geheele voedingsvloeistof heen, terwijl de oppervlakte steeds nat blijft, ook in oudere cultures. Op dezelfde wijze als bij Verticillium alboatrum heb ik een aantal pH-reeksen opgesteld in Richards oplossing met extra ½ % KH_2PO_4, waarbij bleek, dat de onderzochte Fusariumsoorten zich konden ontwikkelen tusschen pH 9 en pH 3 of 2,8. Vanaf pH 8 tot pH 3,5 ontstonden steeds rijkelijk microconidiën. Bij pH 9 waren de schimmels slecht ontwikkeld en bestonden uit korte, vaak gezwollen cellen, terwijl in de cultures bij ongeveer pH 3,0 talrijke chlamydosporen gevormd werden.

We zagen reeds, dat de drie pigmentvormende Fusariën alleen bij een bepaalde zuurgraad dit pigment konden vormen, en het bleek nu, dat dit gebied lag tusschen pH 3,5 en 3,0. In alle cultures, waarvan de pH boven 3,5 bleef, ontstond steeds een kleurloos schimmeldek, terwijl, zoo gauw deze pH bereikt werd, het schimmeldek roodachtig getint werd.

Cultures van de schimmels op rijst gaven steeds een intens roode kleur, wat vermoeden doet, dat hier een zuurgraad van pH 3,5 bereikt wordt. Door een dergelijke culture met eenige c.c. water te extraheeren kon ik echter nooit een zuurgraad zuurder dan pH 4,3 constateeren. Daar de schimmels later de cultures weer alcalisch maken, ligt het voor de hand om aan te nemen, dat de oudste gedeelten der onderzochte cultures reeds bezig waren al-

calisch te worden en geen nieuw pigment meer vormden, terwijl de pas aangetaste gedeelten gedurende eenigen tijd wel een pH van 3,5 hadden en zich dan kleurden.

Het roode pigment schijnt bij alle drie de soorten hetzelfde te zijn. Het is totaal onoplosbaar in water, en wordt slechts in enkele hyphen gevormd, die bij vergrooting als roode lijnen tusschen de kleurlooze hyphenmassa opvallen. Soms ligt het in deze hyphen in de vorm van talrijke roode korrels, soms is het in oliedruppels opgelost, maar steeds zijn het slechts enkele hyphen, die gepigmenteerd zijn. Het is tamelijk zuiver uit de schimmels te isoleeren, daar het uitstekend oplosbaar is in chloroform en niet in alcohol en aether. Gepigmenteerde cultures van vloeibare voedingsbodems, worden hiertoe afgefiltreerd en gedroogd, en later met chloroform uitgetrokken. Na eenige dagen is het grootste gedeelte van het pigment met een fraaie karmijnroode kleur in de chloroform opgelost. Door nu de chloroform te verdampen en het residu met alcohol en aether uit te wasschen blijft het pigment achter. Het is nog verder te zuiveren door het weder in chloroform op te lossen, en er dan een weinig kaliumhydroxyde aan toe te voegen. Het pigment vormt dan een blauw neerslag, kan afgefiltreerd worden en weer opgelost in aangezuurde chloroform. In de cultures van de schimmel op rijst zien we steeds deze rood-blauwe kleuromslag. De jongere cultures zijn altijd rood, daar het pigment alleen in zure omgeving ontstaat, terwijl de oudere cultures, door verhoogde alcaliniteit, o.a. door de vorming van ammoniak bij de autolyse, eerst paars, dan blauw worden.

c. De invloed van mineralen

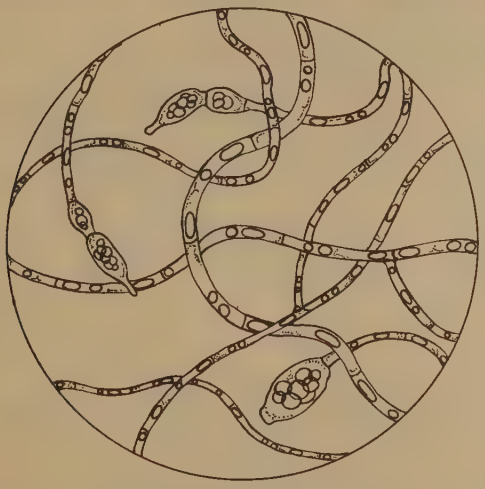
In de vorige paragraaf bleek reeds, dat de verschillende Fusariumsoorten in Richards voedingsbodem uitstekend groeien, zoodat we hierin een goede voedingsbodem vinden voor het onderzoek naar de invloed van mineralen.

Evenals bij Verticillium alboatrum is bij de verschillende Fusariumsoorten de afwezigheid van het ijzerchloride niet aan de ontwikkeling der schimmels te constateeren.

Laten we Magnesiumsulfaat weg, dan heeft er geen ontwikkeling plaats, 0,02 % van dat zout bleek echter reeds voldoende te zijn om de groei ongeveer normaal te doen zijn. Echter had bij

deze cultures zelfs bij gunstige zuurgraad nooit pigmentvorming plaats; dit kon pas optreden bij een $MgSO_4$-concentratie van minstens 0,1 %. Dat evenals bij Verticillium, deze invloed van magnesiumsulfaat veroorzaakt werd door het Mg en niet door het SO_4, bleek uit cultures met voldoende sulfaat en met magnesiumgebrek, die steeds ongepigmenteerd bleven.

In de cultures met magnesium-gebrek (van 0.01 tot 0.1 % $MgSO_4$) was de habitus der schimmels, als we afzien van de pigmenteering, niet verschillend van het normale; conidiënvorming trad overal rijkelijk op. In de cultures met sulfaat-gebrek (0,02 en



Figuur 16
Fusarium conglutinans var. callistephi bij phosphorgebrek.

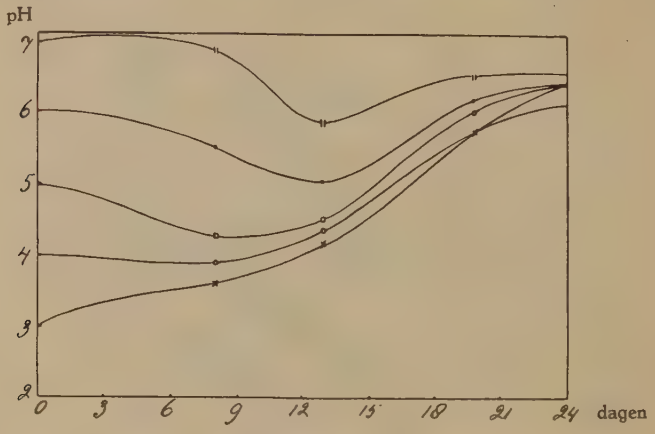
0,01 % $MgSO_4$) werden slechts zeer weinig conidiën gevormd. Deze cultures bleken echter ook minder goed ontwikkeld te zijn dan de normale, vooral de cultures met 0,01 %.

Evenals bij Verticillium bleek ook een KH_2PO_4-concentratie van minstens ¼ % noodzakelijk te zijn voor een normale ontwikkeling. Alle cultures met minder phosphor vertoonden een minder goede ontwikkeling, vormden veel chlamydosporen en bleken zeer veel oliedruppels in de hyphen te bevatten; deze lagen echter niet zoo regelmatig over de hyphen verdeeld als bij Verticillium (fig. 16).

Aan kalium schijnen de schimmels reeds in zeer geringe hoeveelheid voldoende te hebben. Meer kalium dan uit het glas trekt en als verontreiniging in de andere zouten zit, schijnt niet noodzakelijk te zijn, daar ook hier, evenals bij Verticillium, de cultures, waarin alle kalium vervangen was door natrium, niet te onderscheiden waren van de normale.

d. De invloed van de stikstofbron

In ongemodificeerde Richards oplossing, waar dus als stikstofbron uitsluitend nitraat beschikbaar is, is de ontwikkeling goed.



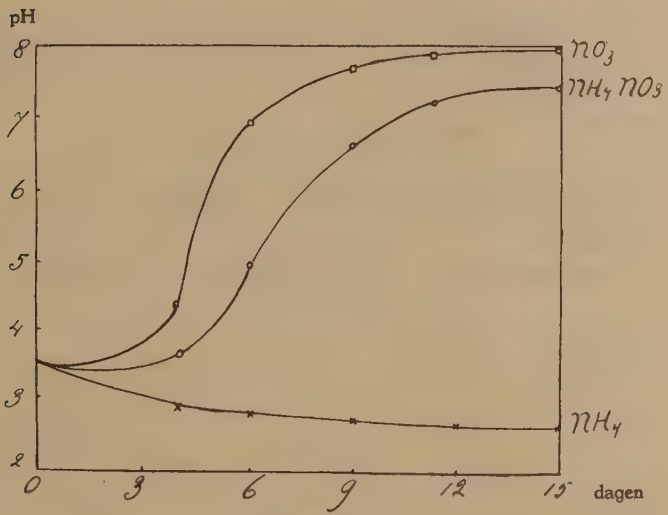
Figuur 17
Zuurgraadverschuiving van Fusarium Lycopersici bij verschillende begin pH op Richards oplossing.

De zuurgraadverschuiving heeft echter een eigenaardig verloop (fig. 17). Gewoonlijk worden de cultures eerst zuur, om daarna weer naar de alkalische kant te verschuiven, terwijl de cultures met een begin pH van 4 en zuurder, al dadelijk alcalisch beginnen te worden. Sideris (60, 61) heeft dit gedrag aan de hand van Fusarium cromyophthoron nader onderzocht, waarbij hij vond, dat het punt, waarbij de cultures in het begin noch alcalischer noch zuurder werden, afhankelijk is van de koolstofbron der cultures. Hij noemt dat punt het isometabolische punt, en vond het voor glucose liggen bij pH 3,8, voor zetmeel bij pH 5,2, voor pectine

bij pH 6,5, voor amygdaline bij pH 5,0, terwijl de schimmel peptonbodems uitsluitend naar de alcalische zijde doet verschuiven.

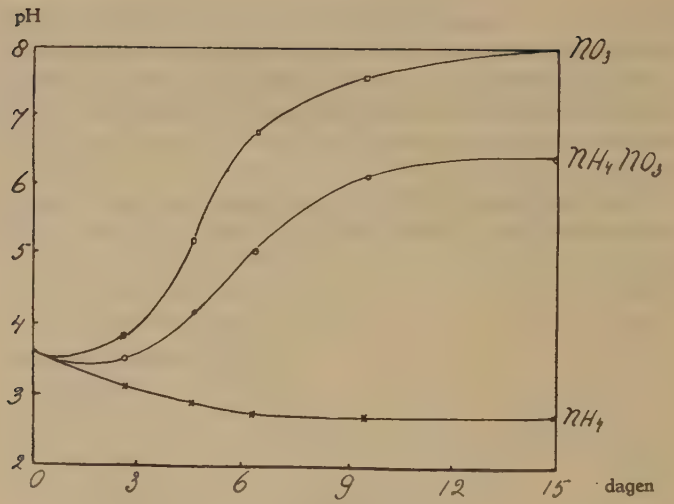
Het isometabolische punt voor glucose bleek bij alle vier hier onderzochte Fusariën te liggen bij een pH van ongeveer 4, en ligt dus niet ver van de waarde, die Sideris voor Fusarium cromyophthoron vond.

Wordt het nitraat uit Richards oplossing vervangen door ammonium, bijv. door in plaats van KNO_3 ammoniumsulfaat te geven,

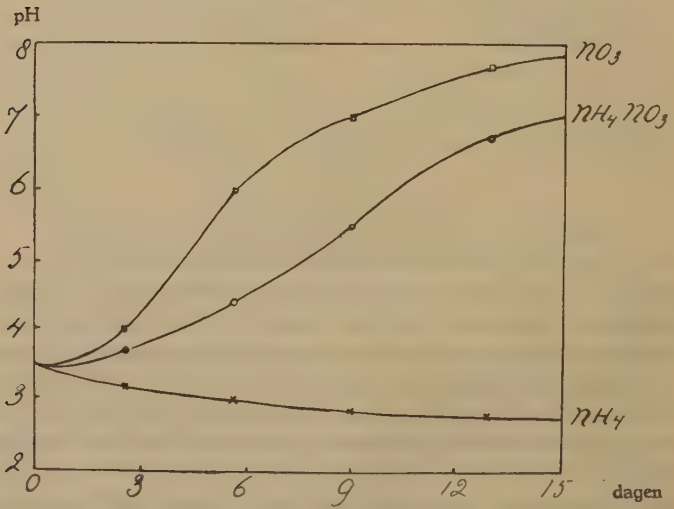


Figuur 18
Zuurgraadverschuiving van Fusarium conglutinans var. callistephi bij verschillende stikstofbron.

dan zien we hetzelfde verschijnsel als bij Verticillium, n.l. dat de voedingsbodem al gauw zoo zuur wordt, dat de schimmels zich niet verder ontwikkelen kunnen. Is er echter behalve ammonium-stikstof ook nog nitraatstikstof aanwezig, dan wijken de onderzochte Fusariumsoorten in hun gedrag van Verticillium af (fig. 18, 19, 20). Geven we bijv. NH_4NO_3, bij een begin pH van 3,6, dan verschuift de zuurgraad der culture in dezelfde richting als bij KNO_3 als eenige stikstofbron, doch veel minder ver. Hier worden dus waarschijnlijk het ammoniumion en het nitraation tegelijk gebruikt en kun-



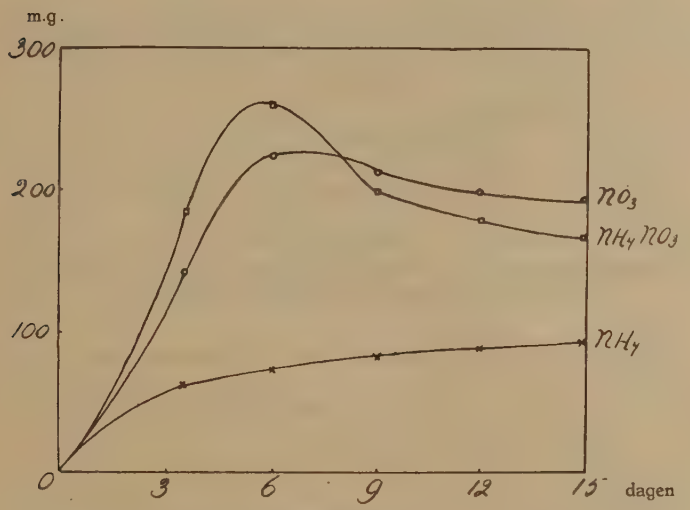
Figuur 19
Zuurgraadverschuiving van Fusarium vasinfectum bij verschillende stikstofbron.



Figuur 20
Zuurgraadverschuiving van Fusarium Lycopersici bij verschillende stikstofbron.

nen we door een bepaalde verhouding ammonium-nitraat, binnen een bepaald gebied een willekeurige zuurgraad een tijd lang handhaven. Hiervan heb ik gebruik gemaakt om cultures van de pigmentvormende Fusariën gedurende eenigen tijd tusschen pH 3,0 en 3,5 te houden, ten einde een voldoende hoeveelheid pigment te verkrijgen.

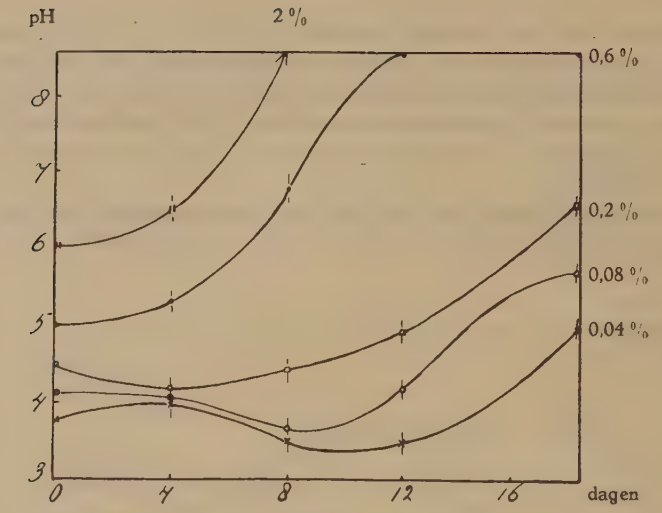
Uit de drooggewichten zien we, dat ammoniumnitraat een betere stikstofbron is dan kaliumnitraat, en ook beter dan ammoniumsul-



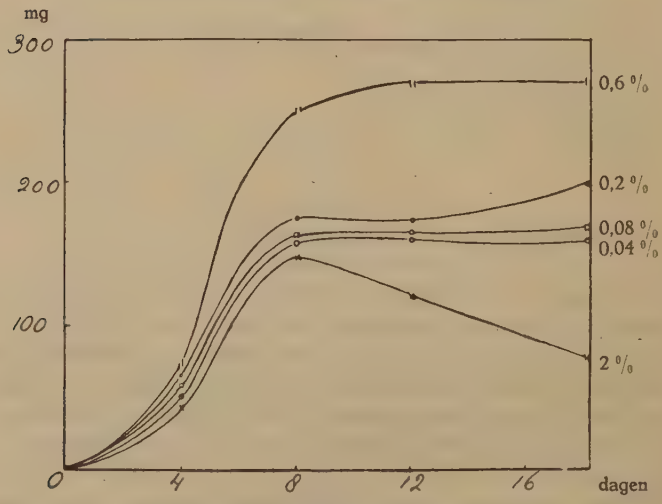
Figuur 21
Drooggewichten van Fusarium conglutinans var. Callistephi bij verschillende stikstofbron.

faat; dit laatste waarschijnlijk, doordat in cultures met ammoniumsulfaat een ongunstige zuurgraad op gaat treden (fig. 21).

Brengen we ureum als eenige stikstofbron in de oplossing, dan blijkt ook Fusarium een aanzienlijke hoeveelheid urease te vormen, waardoor, bij een voldoend sterke ureumconcentratie, door ammoniakvorming de cultuur zoo alcalisch wordt, dat de schimmel afsterft (fig. 22, 23 en tabel 4). Een concentratie van 0,6 % ureum wordt nog verdragen, waarbij de pH op 8,6 gebracht wordt. Komt de pH boven 9, dan ontwikkelt de schimmel zich slecht, en ge-



Figuur 22
Zuurgraadverschuiving van Fusarium conglutinans var. callistephi bij Ureum als stikstofbron in verschillende concentraties.



Figuur 23
Drooggewichten van Fusarium conglutinans var. callistephi bij Ureum als stikstofbron in verschillende concentraties.

bruikt daardoor minder ammoniak, terwijl de ammoniakvorming doorgaat, en de culture steeds alcalischer wordt.

Als we voor Fusarium conglutinans var. callistephi het verschil in ontwikkeling nagaan bij verschillende stikstofbronnen, als am-

TABEL IV

Ureumreeks van Fusarium conglutinans var. Callistephi.

Ureum		14/6	17/6		21/6		25/6		29/6	
		p.H.	drgg.	p.H.	drgg.	p.H.	drgg.	p.H.	drgg.	p.H.
0,1 cc	0,04 %	3,8	40	4,2	165	3,5	160	3,5	160	5,0
0,2 cc	0,08 %	4,1	40	4,0	175	3,5	170	4,2	165	5,8
0,5 cc	0,2 %	4,5	45	4,1	175	4,6	170	4,8	200	6,6
1,5 cc	0,6 %	5,0	40	5,3	255	6,8	270	8,6	270	8,6
5	2 %	6,0	20	6,5	155	8,6	120	9,0	80	9,0

monium, nitraat en asparagine, in gelijke N-concentraties, evenals we dat bij Verticillium gedaan hebben, dan vinden we de volgende cijfers:

op ammonium van pH 7 — 4,5 drooggew. 140 m.g. en 130 m.g.
op nitraat van pH 7 — 6,5 drooggew. 50 m.g. en 40 m.g.
op asparagine van pH 7 — 5,2 drooggew. 120 m.g. en 110 m.g.

Bij deze Fusarium vinden we dus ook de beste ontwikkeling op ammonium, hoewel de cultures op asparagine er niet ver bij achter staan, terwijl de nitraatcultures steeds veel minder goed ontwikkeld zijn.

§ 4. *Verschillen tusschen Fusarium sp. en Verticillium alboatrum*

Het meest opvallende verschil tusschen Verticillium en Fusarium is wel hun gedrag op ammoniumnitraat, dat door Verticillium zuur, door Fusarium meer alcalisch wordt gemaakt. Nu behooren alle in de vorige paragraaf onderzochte Fusariumsoorten tot de sectie Elegans, dus zou het minder zuur maken van de bodem niet een eigenschap behoeven te zijn voor het geheele geslacht Fusarium. Om te weten of er ook Fusariumsoorten zijn, die zich op dezelfde

manier gedragen als Verticillium, heb ik een aantal Fusariën uit alle secties gekweekt op een voedingsbodem met ammoniumnitraat.

F. herbarum	uit sectie	Roseum.
F. aquaeductum	„	Eupionnotes.
F. betae	„	Eupionnotes.
F. poae	„	Sporotrichiella.
F. semitectum	„	Arthrosporiella
F. bullatum	„	Gibbosum.
F. fructigenum	„	Lateritium.
F. polymorphum	„	Discolor.
F. graminearum	„	Saubinetii.
F. solani	„	Martiella.

Al deze Fusariën bleken zich te gedragen als de onderzochte. Al werden ze in het begin soms iets zuurder, na een week waren ze allen toch naar de alcalische kant verschoven. F. aquaeductum, die ook al opvallend is door zijn merkwaardige levenswijze, maakte eerst de voedingsbodem zuur tot zelfs pH 3,5 toe, doch werd later toch weer minder zuur en groeide uitstekend door.

We schijnen hier dus te doen te hebben met een typisch verschil tusschen Verticillium alboatrum en de verschillende Fusarium-soorten.

HOOFDSTUK IV

INVLOED DER STIKSTOFBEMESTING OP DE INFECTIE

In de vorige hoofdstukken zagen we dat zoowel Verticillium als Fusarium een verschillende ontwikkeling vertoonen, naarmate ze de voor de groei benoodigde stikstof uit verschillende verbindingen halen. Stikstof in de vorm van ammoniumzouten bleek zeer bevorderlijk voor de groei, stikstof als asparagine niet veel minder, terwijl nitraten vrij slechte stikstofbronnen bleken te zijn. Brengen we deze feiten over op natuurlijke infectie van planten met deze schimmels, dan zou het voor de hand liggen, dat bij een ammoniumbemesting de infectie grooter zou worden, dan bij een nitraatbemesting. De schimmels kunnen zich in een ammoniumhoudende grond waarschijnlijk beter ontwikkelen, en zullen dus meer infecties teweeg brengen, terwijl bovendien planten, die ammonium opgenomen hebben, dit al dadelijk omzetten in asparagine, zoodat de schimmels ook binnen de planten een uitstekende stikstofbron vinden zullen. Behalve de grootere infectiekans, zal dus ook nog de infectie een sneller verloop kunnen hebben, daar het opstijgende vocht in de houtvaten een betere voedingsbodem zal zijn.

Een stikstofbemesting met ureum zal dezelfde invloed hebben als een ammoniumbemesting, daar ook ureum een uitstekende stikstofbron voor beide schimmels is, en het bovendien in de grond al gauw in ammoniak omgezet wordt.

Om na te gaan of deze invloeden van de stikstofbemesting werkelijk optreden, heb ik een aantal zand- en watercultures aangelegd, waarin de stikstof in verschillende vormen gegeven werd. Hiervan werd na eenigen tijd het zand of het water vermengd met

eenige druppels van een sporenemulsie van de schimmels, zoodat de aantasting zoo natuurlijk mogelijk verliep.

§ 1. *Methodiek*

De volgende proeven zijn gedaan in een warenhuis, waar dus de temperatuur niet goed regelbaar was, en vrij groote schommelingen vertoonde. Daar de infectie met Verticillium sterk van de temperatuur afhankelijk is, gelukten deze infecties in het warmste gedeelte van den zomer niet. Dan bleef de temperatuur gedurende het grootste gedeelte van den dag boven de 25 graden, en bereikte zelfs vaak 40 graden. In dezen tijd herstelden de planten, die reeds duidelijke symptomen van verwelking vertoonden, zich weer, waarbij ze de onderste, meest geïnfecteerde bladeren lieten vallen.

Bleef de temperatuur overdag beneden 30 graden, wat in de voor- en nazomer bijna steeds het geval was, dan verliep de infectie normaal.

De Fusarium-infectie op asters bleek gedurende den geheelen zomer zoowel bij hoogere als bij lagere temperaturen steeds voor bijna 100 % te gelukken; bij hoogere temperaturen gingen de planten alleen iets sneller te gronde.

Als proefplant voor de Verticillium-infectie werd genomen de tomaten-variëteit Ailsa Graig, terwijl voor de Fusarium-infectie verschillende variëteiten van Chineesche asters gebruikt werden, die allen ongeveer even vatbaar bleken te zijn. Voor elke reeks werd natuurlijk één variëteit gebruikt, om de infecties vergelijkbaar te maken.

De tomatenplantjes werden in bladaarde uitgezaaid en na één maand overgeplant in de proefpotten, telkens 3 à 4 plantjes per pot. In deze potten bevond zich goed uitgewassen zand, waarin de verschillende voedingszouten gebracht waren. Nadat de plantjes hierin gedurende veertien dagen of drie weken gegroeid waren, werden ze er voorzichtig uitgehaald; daarna werd het zand goed doorwoeld tot onder aan toe, met een sporenemulsie van Verticillium Stam 6, waarna de plantjes er weer ingezet werden.

Een week of drie na deze infectie waren, bij gunstige temperatuur de eerste symptomen der ziekte te zien aan het slap hangen

en geel worden der oudste blaadjes. Langzamerhand werden daarna ook de jongere bladeren slap en vielen de oudere bladeren af.

De asters werden eveneens in bladaarde uitgezaaid, doch pas na een paar maanden in de proefpotten geplant. De infectie geschiedde evenals bij de tomaten door een sporenemulsie van Fusarium door het zand heen te woelen.

Ook werden een aantal infecties gedaan in watercultures op van der Crone's oplossing, waarop zoowel tomaten als asters een goede ontwikkeling vertoonden. Plantjes van één maand oud werden op van der Crone's oplossing gezet en een week later geïnfecteerd door een sporenemulsie tusschen de wortels in te druppelen. Bij tomaten kon ik echter bij deze watercultures nooit een goed gelukte infectie constateeren; de planten verwelkten niet, evenmin kleurden de houtvaten zich donker. De asters waren op watercultures nog veel gevoeliger voor de schimmel dan in zand en vertoonden soms na één week al een duidelijk ziektebeeld.

De zuurgraad van den grond werd bepaald met behulp van Lamotte's soil teskit, waarbij eenige druppels indicator op een weinig grond gebracht wordt, daarna daar doorheen vloeit en dan de kleur der zuurgraad van den grond aangenomen heeft. Een dergelijk colorimetrisch bepalen der zuurgraad van grond is zeer geschikt, wanneer we te doen hebben met uitgewasschen zand, daar dit van zich zelf geen kleur afgeeft.

§ 2. *Fusarium infectie bij asters*

Daar asters, die op watercultures groeien, door het brengen van een aantal Fusariumsporen in de vloeistof ongeveer voor 100 % geïnfecteerd worden, en deze infectie tevens zeer snel verloopt, hebben we hierin veel beter materiaal om de invloed der stikstofbron te bepalen, dan de Verticilliuminfecties van de tomaten ons leveren.

Asters, die reeds een flink rozet gevormd hebben in de kweekbakken, ontwikkelen zich verder heel goed op Van der Crone's oplossing, en vormen er normale bloemen op. Dergelijke asters werden elk gezet op een Erlemeyerkolf van 300 c.c. gevuld met de bovengenoemde oplossing, waarvan echter gewoonlijk de KNO_3 vervangen was door een andere stikstofbron. Deze oplossing werd

elke week ververscht. Het bleek, dat de asters zich op ammoniumchloride en op ureum als N-bron bijna even goed ontwikkelden als op kaliumnitraat. Misschien was de groei iets langzamer, duidelijke verschillen waren echter niet te constateeren. Als de planten werkelijk alleen nitraten voor hun ontwikkeling kunnen gebruiken, dan zullen de talrijke bacteriën op de wortels wel voor voldoende nitraten-aanmaak gezorgd hebben. Een schadelijke werking van NH_4Cl in een concentratie van 0,1 % kon ik niet constateeren.

De infecties hadden plaats door eenige druppels van een sporenemulsie bij de voedingsoplossing te brengen, nadat de planten er minstens een week op gestaan hadden. Eenige dagen later duiden reeds een aantal dikkere en geelachtige wortels de goedgelukte infecties aan, terwijl weer eenige dagen later de onderste bladeren, daarna de geheele planten beginnen te verwelken.

TABEL V

Aantal dagen na infectie	KNO_3	NH_4NO_3	Ureum	NH_4Cl
7	...	..—	—.—	.— —
9	...	..—	— —±	.—±
11	—.—	—.—	— —±	—±±
13	— — —	—±±	±±±	±±±

In de tabellen is een geheel turgescente plant aangegeven door een punt, een plant waarvan alleen de onderste bladeren verwelkt zijn door —, en geheel verwelkte plant door het teeken ±

Tabel V geeft het verloop aan van een aantal infecties bij planten, groeiende op voedingsbodems met ongeveer aequivalente hoeveelheden stikstof in de vorm van KNO_3 0,1 %, NH_4NO_3 0,04 %, ureum 0,03 % en NH_4Cl 0,05 %, van elk drie planten.

Hoewel het aantal der onderzochte planten hier zeer gering is, blijkt uit deze tabel toch reeds een duidelijk sneller verloop der infectie bij planten, die over veel ammonium beschikken. Of het ureum als zoodanig ook deze infectie-versnellende invloed heeft, moeten we in het midden laten, daar het vrij alcalisch worden van de voedingsoplossing wijst op een hydrolyseering ervan tot ammoniak, een werking, die we, zooals in het vorige hoofdstuk bleek,

aan de zich ontwikkelende schimmel alleen al toe kunnen schrijven.

De zuurgraad bleek na 14 dagen voor de KNO_3-planten te liggen bij pH 7,0, voor de NH_4NO_3-planten bij pH 7,0, voor de ureum-planten bij pH 8,3 en voor de NH_4Cl-planten bij pH 6,8.

Een aantal asters op gewone v. d. Crone-oplossing, waarvan de zuurgraad om de twee dagen bijgeregeld werd tot pH 6, 7 en 8, van elke drie, vertoonden na infectie een gelijk verloop van het verwelken, zoodat de zuurgraad bij deze pH-waarden geen groote invloed op het verloop der infectie kan hebben.

Ook uit de volgende tabel blijkt de infectieversnellende werking van de NH_4-ionen.

TABEL VI

Aantal dagen na infectie	KNO_3	NH_4NO_3	Ureum	NH_4Cl
8 dagen	..—	—	±±±	±±±
15 „	—.—	±	±±±	±±±
22 „	±—±	±	±±±	±±±
pH. na 8 dagen	7,8	7,3	8,5	7,1

Tot nu toe zijn de stikstofhoeveelheden, die in de oplossingen gebracht zijn, steeds aequivalent genomen met 0,1 % KNO_3, in de volgende reeks zijn van elk der stikstofverbindingen verschillende concentraties in oplossing gebracht.

TABEL VII

Aantal dagen na infectie	NH_3Cl			NH_4NO_3			geen stikstof	KNO_3		
	1/3 %	1/6 %	1/30 %	1/3 %	1/6 %	1/30 %		1/3 %	1/6 %	1/30 %
6 dagen	—	.	.	—	.	.	...	.	.	.
8 dagen	±	.	.	±	—	.	...	—	.	.
10 dagen	±	—	.	±	—	.	...	—	.	.
14 dagen	±	±	—	±	±	.	...	±	—	.
18 dagen	±	±	—	±	±	—	.—±	±	±	.

Deze reeksen vertoonen duidelijk behalve de infectieversnellende werking van het ammoniumion, ook nog dezelfde werking van de

TABEL VIII

Infectie-datum 21/6

per pot	2 ureum —	1 ureum 1 KNO_3	1 ureum 1 NH_4NO_3	1 ureum 1 NH_4Cl	2 KNO_3 —	1 KNO_3 1 NH_2NO_3	1 KNO_3 1 NH_4Cl	2 NH_4NO_3 —	1 NH_4NO_3 1 NH_4Cl	2 NH_4Cl —
10/7	−..	−..	...	±−.	...	...	...	...	−−.	−..
18/7	±−.	−..	−−.	±−.	...	...	−..	...	±±.	±..
26/7	±−−	−..	±−.	±−.	...	...	−−.	−..	±±−	±−.
7/8	±±−	±−.	±±−	±−.	...	−..	−−.	±−.	±±±	±−−
12/8	±±−	±−−	±±±	±±−	...	±..	±−.	±−−	±±±	±±−
20 8	±±±	±−−	±±±	±±±	.−.	±..	±±.	±±±	±±±	±±±

TABEL X

Infectie-datum 6/6

Datum	Ureum					NH_4NO_3					
	5	2	1	0,5	0,2	5	2	1	0,5	0,2	cc.
20/6	±±−	±−.	−−.	−−.	−..	−..	...	...	...	...	
29/6	±±±	±−.	±−.	±±−	±−.	−−.	−..	−..	...	...	
6/7	±±±	±±−	±±±	±±±	±±.	±±.	±−−	−−.	−..	...	
13/7	±±±	±±±	±±±	±±±	±±.	±±±	±−−	±−.	−..	...	

stikstofconcentratie, wat dus weer geheel in overeenstemming is met de bevindingen van Schaffnit en Volk.

De volgende reeksen geven het verloop van infecties op zandcultures, waarin de stikstof in verschillende vorm en hoeveelheid gegeven werd.

Tien drie-liter-potten werden gevuld met uitgewasschen zand, waaraan toegevoegd werden: 0,4 g. KCl, 0,2 g. $CaH_4(PO_4)_2$, 0,4 g. $MgSO_4$, 0,06 g. $FeCl_3$ en 1 g. $CaCO_3$. De stikstof werd gegeven in verschillende vormen, n.l. als ureum, kaliumnitraat, ammoniumnitraat en ammoniumchloride, of als een combinatie van twee dezer stoffen. In tabel VIII stelt elke keer, dat ureum genoemd is voor: een hoeveelheid van 10 c.c. van een 3 % oplossing; elke keer KNO_3 een hoeveelheid van 10 c.c. van een 10 % KNO_3-oplossing; elke keer NH_4NO_3 beteekent 10 c.c. van een 4 % oplossing, en elke keer NH_4Cl 10 c.c. van een 5 % oplossing hiervan per pot. De hoeveelheden stikstof zijn per pot dan ongeveer gelijk.

Uit tabel VIII blijkt, dat ook in zandcultures de infectieverhoogende werking van het ammonium duidelijk is. De pot met uit-

TABEL IX

Infectie van den grond op 6/6

Ureum KNO_3	2,5 cc.	2 cc. 1 cc.	1 cc. 2 cc.	0,5 cc. 3 cc.	 6 cc.
20/6	− − −	− − .	− . .	. . .	. . .
29/6	± ± −	± − −	± − .	. . .	− . .
6/7	± ± ±	± ± ±	± ± −	− − .	± − .
13/7	± ± ±	± ± ±	± ± ±	± − .	± ± .

sluitend KNO_3 bracht op 10 Sept. zelfs nog twee bloeiende planten voort, terwijl de planten in de andere potten op die datum allen reeds afgestorven waren.

Ook de volgende reeks, waarin dezelfde stikstofvrije bemesting gegeven is als bij de vorige, en waarin de stikstof toegediend werd in verschillende verhoudingen van ureum en KNO_3, leidt tot dezelfde resultaten. In de tabel zijn de stikstofhoeveelheden gegeven in c.c. van 30 % oplossingen (tabel IX).

Tot slot volgt nog een dubbele reeks, waaruit blijkt, dat ook in zandcultures de infectie sneller verloopt bij hoogere concentratie der stikstofbron en dat bij een ureumbemesting ook een betere infectie plaats heeft dan bij een bemesting met ammoniumnitraat (tabel X).

Bij al deze reeksen over zandcultures kan de invloed van de zuurgraad wel uitgeschakeld worden, daar door het groote kalkgehalte der grond de zuurgrraadsverschuiving steeds minimaal is gebleven. De grootste verschillen, die ik waargenomen heb, bedroegen niet meer dan 0,5 pH-eenheden. Zooals we reeds gezien hebben heeft een ongeveer gelijke infectie plaats van pH 6 tot pH 8 en de zuurgraad der zandcultures lag steeds binnen deze grenzen en ongeveer bij het neutrale punt.

§ 3. *Verticillium-infectie bij Tomaten*

Een aantal potten, elk met 12 L. inhoud, werden gevuld met uitgewasschen zand, en hierin kwamen als voedingszouten 1,4 g. KCl, 1 g. $CaH_4(PO_4)_2$, 1,4 g. $MgSO_4$, en 0,2 g. $FeCl_3$. De stikstof werd toegevoegd op de volgende wijzen: in 4 potten 6 g. NH_4Cl, in 4 potten 8 g. KNO_3, en in 4 potten 4 g. ureum.

In elke pot werden nu 4 tomatenplantjes geplant van ongeveer 10 c.M .hoogte.

Na 14 dagen werden van elke groep van 4 potten er drie geïnfecteerd met Verticillium.

Na de infectie volgden er eenige weken van vrij koel weer, met weinig zon, zoodat in het warenhuis, waar de proefplanten in stonden, de temperatuur weinig boven de 25 gr. of onder de 15 gr. C. kwam. Deze temperatuur was dus bij uitstek goed voor de infectie, die zooals we in hoofdstuk I zagen het best verloopt bij ongeveer 20 gr., terwijl boven 25 gr. de infectie niet plaats heeft, of als de planten reeds geïnfecteerd zijn, terugloopt, zoodat de schimmel na verloop van tijd geheel uit de plant verdreven is. Na 14 dagen vertoonden dan ook alle planten uit de geïnfecteerde potten, uitgezonderd de NH_4Cl-potten, duidelijk de verschijnselen van verwelkingsziekte, d.w.z. de onderste bladeren kregen gele vlekken of werden geheel geel en hingen op het warmste deel van de dag slap. Uit dergelijke bladeren kon ik steeds weer Verticillium isoleeren. De NH_4Cl-potten, die geënt waren met de schim-

mel, bevatten planten die slechts groene, niet verwelkte bladeren droegen, doch deze planten waren toch iets achtergebleven bij de pot met contrôle-planten, zoodat ze misschien toch wel geïnfecteerd zouden kunnen zijn. Om dit te onderzoeken, heb ik ook van deze planten een stukje van de steel van het onderste blad op een voedingsbodem gelegd, en het bleek, dat ook hier zonder uitzondering zich Verticillium uit ontwikkelde. Bij de hoogere bladeren gelukte deze isolatie vaak niet, evenmin als uit de hoogere bladeren der planten uit de potten met andere stikstofbemesting. De infectie was dus bij de NH_4Cl-planten ongeveer evenver doorgegaan als bij de andere planten, alleen het ziektebeeld was veranderd.

Als we de contrôles van de NH_4Cl-planten vergelijken met de contrôles van de andere planten, dan valt al dadelijk een duidelijk verschil in het oog. Deze planten zijn namelijk veel donkerder groen gekleurd, zijn lager gebleven en hebben iets vleeziger bladeren. Tusschen de KNO_3 en de ureum-planten kon ik geen verschil opmerken.

Daar NH_4Cl op den duur de bodem zuurder maakt, en het uitgewasschen zand geen groote buffercapaciteit heeft, was het zeer waarschijnlijk, dat deze verschillen tusschen de NH_4Cl-planten en de andere planten door een verschil in de zuurgraad van de bodem te voorschijn geroepen werd. Bij colorimetrische bepaling van de zuurgraad van den grond in de verschillende potten met Lamotte's Soil-Teskit bleek de pH van het zand in de NH_4Cl-potten verschoven te zijn van 6,5 tot ongeveer 5,0. Die van de KNO_3-potten van 6,5 tot 7,0 en die van de ureum-potten van 6,5 tot 7,4. Het is dus wel waarschijnlijk, dat de zuurgraad voor de verschillen tusschen de planten verantwoordelijk is.

Om dit na te gaan werden een aantal tomatenplantjes op watercultures gezet met verschillende pH. Als voedingsoplossing werd gebruikt Van den Crone's oplossing, en de zuurgraad werd om de andere dag bijgeregeld met KOH en HCl. De plantjes bleken tusschen pH 5 en 8,5 goed te groeien, hoewel deze beide uitersten iets achterbleven bij de anderen. De plantjes die op een pH van 5 groeiden, waren ook veel donkerder dan de anderen en hadden ook iets dikkere bladeren, zoodat ze geheel dezelfde afwijkingen vertoonden als de NH_4Cl-planten uit de vorige reeks. De stikstof-

bron in Van der Crone's oplossing is KNO_3, zoodat in geen geval de stikstofverbinding de primaire oorzaak is van de verschillen tusschen de NH_4Cl-planten en de andere kan zijn, doch de zuurgraadverschuiving, die erdoor veroorzaakt wordt.

Het infecteeren der planten op de watercultures door sporen der schimmels in de voedingsoplossing te brengen, mislukte bij alle planten dezer pH-reeks, zoodat we bij die reeks niet de invloed der zuurgraad op de infectie kunnen nagaan; doch daar de planten uit de eerste reeks zandcultures allen ongeveer tegelijk en even sterk geïnfecteerd waren, kunnen we daar wel eenigszins uit besluiten, dat noch zuurgraad, noch de vorm, waarin de stikstof toegediend wordt, veel invloed op de infectie uitoefenen. Alleen heeft de zuurgraad wel invloed op het ziektebeeld, dat veel minder duidelijk tot uiting komt, in de zuurdere cultures.

Later, ongeveer een maand na het infecteeren van den grond, was het ziektebeeld bij de NH_4Cl-planten nog steeds minder duidelijk. Op warme dagen hingen wel eenige planten geheel slap, doch de gele verkleuring trad niet of slechts in zeer geringe mate op.

Na anderhalve maand ving een warme periode aan, waarbij de temperatuur midden op den dag gewoonlijk een eind boven de 30 gr. kwam. Na eenige van deze warme dagen verwelkten de planten zoo sterk, dat ze zich niet meer herstellen konden en waarna ze al gauw verdroogd waren. Andere planten, die nog slechts veertien dagen voor deze warme periode geïnfecteerd waren geworden, en waarbij het ziektebeeld reeds hier en daar te voorschijn begon te treden, herstelden zich gedurende deze periode geheel, terwijl de reeds geel geworden blaadjes afvielen. Hierbij was de schimmel waarschijnlijk nog niet zoo ver in de vaten doorgedrongen, zoodat de verwelking nog maar gedeeltelijk bleef, en de rest van de plant zich verder kon ontwikkelen en de schimmel kon verdringen. De bruine verkleuring der vaten die reeds aangetast waren, bleef bestaan, zoodat later, toen de schimmel reeds geheel verdwenen was, toch nog goed na te gaan was hoever de infectie zich uitgebreid had.

Om nog eens de invloed van verschillende stikstofzouten na te gaan en tevens de invloed van de concentratie van deze zouten te onderzoeken, werden de volgende proefreeksen opgesteld.

Vijf potten, elk met drie liter inhoud, werden gevuld met uit-

gewasschen zand, en bemest met 0,4 g. KCl, 0,2 g. $CaH_4(PO_4)_2$, 0,06 g. $FeCl_3$, 0,4 g. $MgSO_4$ en 1 g. $CaCO_3$. Zij kregen allen verschillende hoeveelheden stikstof, n.l.:

0,2 c.c., 0,5 c.c., 1c.c., 2 c.c., 5c.c. van een 30 % oplossing van NH_4NO_3. Vijf andere potten met een dergelijke bemesting kregen als N-bron 0,2 c.c., 0,5 c.c., 1 c.c., 2c.c., 5 c.c. van een 30 % oplossing van $(NH_4)_2SO_4$. Ten slotte nog vijf dergelijke potten met dezelfde hoeveelheden stikstof van een 30 % oplossing van KNO_3 (zie tabel).

TABEL XI

Verloop van de infectie van Verticillium alboatrum op tomatenplanten

Infectie-datum: 1 September

Stikstofbemesting:		$(NH_4)_2SO_4$					NH_4NO_3					KNO_3				
Hoeveelheid in cc.		5	2	1	0,5	0,2	5	2	1	0,5	0,2	5	2	1	0,5	0,2
Aantal gelukte infecties op:	14/9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	18/9	2	1	1	1	0	2	2	2	1	1	1	3	2	1	0
	23/9	2	2	2	1	0	3	2	2	1	1	2	3	2	1	0
	28/9	2	2	3	1	0	3	2	2	1	1	2	3	3	1	0
	2/10	2	2	3	1	0	3	2	2	2	1	3	3	3	1	1
		totaal 8 infecties.					totaal 10 infecties.					totaal 11 infecties.				

De infectie had plaats op 1 September, toen de dagtemperatuur weer geschikt bleek voor de infectie, nadat een week van te voren in elke pot drie plantjes geplant waren.

Na 18 dagen begonnen reeds enkele gele en verwelkende blaadjes een goedgelukte infectie te verraden. Tot 2 October werden deze reeksen waargenomen, doch het aantal der geïnfecteerde planten vergrootte zich slechts langzaam (zie tabel XI).

Door het groote kalkgehalte was de zuurgraadverschuiving van deze reeksen gering gebleven. De potten met ammoniumsulfaat hadden op 2 October een pH tusschen 7,0 en 6,5, de KNO_3-potten een pH tusschen 6,8 en 7,2, en de potten met ammoniumnitraat een pH tusschen 6,6 en 7,2.

Als we in de tabel de verschillende reeksen met elkaar verge-

lijken, dan blijkt daar geen sterkere infectie uit voor de ammoniakplanten. De infectie is bij alle drie de reeksen ongeveer even sterk. Doch wat wel opvalt is, dat de infecties talrijker zijn bij de grootere concentraties van de stikstofzouten. Dit laatste is geheel in overeenstemming met wat Schaffnit en Volk voor verscheidene andere infectie-ziekten vonden en met ervaringen uit de praktijk. Het schijnt dus dat de infectie van Verticillium op tomaten niet afhankelijk is van de qualiteit der stikstofbron, doch wel van de quantiteit ervan.

Een verklaring hiervoor te vinden lijkt me nog niet goed mogelijk, daar we nog te weinig af weten van wat er precies gebeurt in de plant, bij opname van een bepaalde stikstofverbinding.

HOOFDSTUK V

DE ROL VAN TOXINEN IN DE VERWELKINGSZIEKTEN

Het verwelken van planten, die aan verwelkingsziekten lijden, wordt in de nieuwere publicaties altijd toegeschreven aan stoffen, die door de schimmels in de waterbanen afgescheiden worden, en die voor de planten sterk toxisch zouden zijn. Vroeger veronderstelde men een zoo groote opeenhooping van mycelium in de vaten, dat daardoor het watertransport ernstig verstoord zou worden, doch daar in de meeste gevallen slechts enkele draden in de houtvaten aangetroffen konden worden, heeft men dit standpunt moeten laten varen, en er verschijnt dan ook haast geen publicatie meer over verwelkingsziekten of een gedeelte ervan is gewijd aan de voor de plant toxische stoffen, die door de schimmels afgescheiden worden.

Met dat al is men echter nog niet veel verder gekomen met de kennis van deze toxinen, vooral door het groote aantal tegenstrijdige resultaten.

Deze tegenstrijdigheden kunnen we grootendeels toeschrijven aan een veel te eenvoudige opvatting over de aard van de toxinen. De meeste auteurs veronderstellen, dat de schimmel een enkele schadelijke stof maakt, sommigen gaan zelfs zoo ver, dat ze bij alle verwelkingsziekte-veroorzakende schimmels hetzelfde toxine aannemen, wat natuurlijk zeer onwaarschijnlijk is, daar zeer talrijke stoffen toxisch op de plantenweefsels inwerken. Zoo vond White (68) dat organische zuren als azijnzuur, propionzuur, boterzuur, valeriaanzuur, melkzuur, oxaalzuur, tartaarzuur en benzoezuur allen reeds in concentraties van 0,06 % af tomatentakjes

doen verwelken, terwijl hij in de cultures van Fusarium Lycopersici zouten aantoonen kon van al deze zuren. Haskell (32) en Prat (51) vonden beiden, dat gedoode weefsels van de plant zelf ook sterk toxisch zijn voor de levende deelen. Het is dus zeer zeker niet een typische eigenschap van de verwelkingsziekte veroorzakende schimmels om toxinen te produceeren. Als we deze schimmels dan ook vergelijken met gewone saprophyten als Penicillium glaucum, dan blijken volgens Barnum (6) en Picado (50) in cultures van deze schimmel toxinen te ontstaan, even sterk, als in cultures van Fusarium en van Verticillium.

Waar dus zoo vele en verschillende stoffen toxische invloeden uitoefenen op het plantenweefsel, zal het ons niet verwonderen als White (68) de toxinen vindt als colloidale stoffen, die door koken niet vernietigd worden, Rosen (57) als een combinatie nitrieten en een vluchtige toxische stof, Goss (30) als een thermolabiele stof, Picado (50) als een stof, die na koken nog sterker toxisch kan zijn dan ervoor, Bewley (16) als een stof, die met alcohol neergeslagen kan worden, en die bij het koken het grootste deel van zijn toxische eigenschappen verliest; vooral niet als we daarbij in acht nemen, dat White werkte met Fusarium Lycopersici, Rosen met F. vasinfectum, Goss met F. eumartii, Picado met F. solani en Bewley met Verticillium alboatrum.

Een goed litteratuuroverzicht voor deze onderzoekingen geeft Rosen (57). Hierin vinden we echter alleen de litteratuur over de schimmels van de verwelkingsziekten, niet over de veel beter onderzochte afscheidingsproducten van rottingsschimmels als Botrytis cinerea, die voor dat ze in het plantenweefsel doordringen, dit eerst dooden, met deze stoffen. Deeds De Bary (7) is in 1886 met deze onderzoekingen begonnen, en vond de voornaamste veroorzaker van het afsterven van het plantenweefsel in een enzym, terwijl hij ook nog aan door de schimmel afgescheiden oxalaten een zekere rol hierbij toeschreef. Behrens (11) ontkende de werking van dit enzym, terwijl Smith (63) ertoe kwam om aan te nemen, dat de geheele toxische werking alleen veroorzaakt werd door oplosbare oxalaten. Brown (19) maakt het door zijn proeven waarschijnlijk, dat zoowel het macereeren van het plantenweefsel als het dooden hiervan veroorzaakt wordt door een enkel enzym, dat bij 60 gr. inactief wordt. Ook hier treffen we

dus een aantal tegenstrijdige resultaten aan, doch de zorgvuldige bereiding van het schimmelextract door B r o w n maakt een enzym als voornaamste veroorzaker zeer waarschijnlijk, al zullen de feiten misschien niet zoo eenvoudig zijn als hij ze veronderstelt.

Enkele onderzoekingen over verwelkingsziekten veroorzakende schimmels wijzen ook op toxinen in de vorm van enzymen. Zoo vindt B e w l e y (16) voor Verticillium, dat van de oplossing, waar deze schimmel op gegroeid is, het alcoholneerslag weder opgelost in water, nog sterk toxisch is, doch deze eigenschap bij verhitten voor het grootste gedeelte verliest. G o s s (30) vindt bij Fusarium eumartii een toxine, dat aardappelweefsel macereert en thermolabiel is. De meeste onderzoekers (Picado, White, Barnum, e.a.) komen echter tot het resultaat, dat het voornaamste toxine van hun schimmel door koken niet beschadigd wordt, zoodat we niet met een enzymwerking te doen kunnen hebben.

Aan een beschouwing eenigszins parallel aan die van S m i t h, dat Botrytis door de afscheiding van oxalaten toxisch zou werken, ontbreekt het bij de verwelkingstoxinen ook niet. R o s e n (57) stelt nitrieten, die ontstaan door reductie van nitraten door de schimmels verantwoordelijk voor de verwelking van de geïnfecteerde planten. Deze zienswijze grondt hij op de volgende feiten: 1. In reinculturen, die nitraten bevatten, vormt Fusarium vasinfectum een zoo groote hoeveelheid nitriet, dat katoenstengels daarop binnen enkele uren zouden verwelken. In cultures van 2 à 3 weken oud, is de hoeveelheid stikstof van de in de voedingsbodem gevormde nitrieten ongeveer 0,04 m.g. per c.c. van de voedingsoplossing, d.w.z. evenveel nitriet als in een 0,04 % $NaNO_2$-oplossing. Deze concentratie wordt echter alleen gevonden als de schimmel groeit op een bodem, die rijk is aan nitraat, zooals bijv. Richards oplossing. InUschinsky oplossing, waar de stikstofbron pepton is, worden geen nitrieten gevormd, en is de afgefiltreerde bodem ook haast niet toxisch voor katoenstengels. 2. Als katoenplanten in grond, waarin de schimmel zich bevindt, sterk bemest worden met kaliumnitraat, dan is de infectie veel sterker dan in niet bemeste grond. De schimmel zou hier, doordat er veel nitraat tot nitriet gereduceerd wordt, gemakkelijker in staat zijn om de wortels der planten binnen te dringen, daar deze door de vergiftige werking van het nitriet reeds verzwakt zijn.

In verband met deze hypothese van Rosen publiceerde Dufrenoys (29) een artikel, waarin hij constateert, dat in nitraathoudende cultures van Verticillium alboatrum ook een zekere hoeveelheid nitriet ontstaat. Quantitatieve bepalingen doet hij hierover echter niet, zoodat we hier niet veel verder mee komen.

Verder vermeldt Beach (8) dat bij de verwelkingsziekte van asters door Fusarium conglutinans v. callistephi door een extra nitraatbemesting de infectie sterk versneld wordt.

Het is echter waarschijnlijk, dat deze infectievergrootende werking van het nitraat niet komt door de groote nitrietvorming, doch door het grootere stikstofgehalte van de grond. Zooals we in het vorige hoofdstuk zagen, zou de verhoogde infectie ook opgetreden zijn, als we extra ammoniak gegeven hadden, zelfs, bij asters althans, in nog sterkere mate, terwijl de nitrietvorming dan toch niet verhoogd zou zijn.

Om de hypothese van Rosen te toetsen heb ik de volgende verwelkingsziekteveroorzakende schimmels onderzocht op hun nitrietvorming op Richards voedingsoplossing: Verticillium alboatrum, Fusarium vasinfectum, F. oxysporium, F. lycopersici en F. conglutinans var. callistephi.

De schimmels werden geënt in Petrischalen op 25 c.c. Richards oplossing, echter met verschillende stikstofbron. Van elke schimmel werden drie reeksen opgesteld, een met KNO_3, een met NH_4NO_3 en een met NH_4Cl, terwijl elke reeks bestond uit vijf schalen. Deze schalen werden onderzocht 3, 5, 7, 10 en 14 dagen na het enten, en ze bleven gedurende deze tijd in een thermostaat op 24 gr. in het donker staan.

Het nitriet werd bepaald volgens de methode Raschig, door in de te onderzoeken vloeistof 5 c.c. 5 % KJ, 5 c.c. 1 % zetmeeloplossing en 5 c.c. normaal HCl te brengen, alles onder doorvoering van CO_2 ter verdrijving van de zuurstof. Bij aanwezigheid van nitriet kleurt de vloeistof zich donkerblauw, en wordt dan met natriumthiosulfaat getitreerd tot de kleur verdwenen is.

Na drie dagen was er in geen enkele schaal nitriet aan te toonen, evenmin na vijf dagen. Na zeven dagen waren alle schalen met Fusarium nog steeds vrij van nitriet, en bleven dit na tien en veertien dagen nog. De schalen met Verticillium op KNO_3 hadden na zeven dagen een nitrietgehalte aequivalent met 0,002 % $NaNO_2$,

na tien dagen aequivalent met 0,001 % $NaNO_2$ en na 14 dagen aequivalent met 0,002 % $NaNO_2$.

De afwezigheid van nitriet in de Fusariumcultures is waarschijnlijk veroorzaakt door de zuurgraad van deze cultures, die zooals we in hoofdstuk II zagen, langen tijd aan de zure kant van het neutrale punt blijft, terwijl de Verticilliumcultures al gauw een pH 8 bereiken. Daar het HNO_2 in oplossing zeer onbestendig is,

TABEL XII

Tomatenplantjes op verschillende nitriet-concentraties

	0,2 %	0,1 %	0,05 %
Na 2 dagen	bruine wortelpuntjes.	normaal.	normaal.
„ 4 „	bruine wortels	groeit niet.	groeit niet.
„ 6 „	dood	groeit niet.	groeit niet.
„ 8 „		wortels dik, geel.	wortels dik, geel.
„ 10 „		dood.	plantjes slap.
„ 12 „			dood.
„ 14 „			

	0,025 %	0,01 %	0,005 %	$NaNO_2$
Na 2 dagen	normaal	normaal	normaal	
„ 4 „	„	„	„	
„ 6 „	„	„	„	
„ 8 „	„	„	„	
„ 10 „	„	„	„	
„ 12 „	„	„	„	
„ 14 „	„	„	„	

zal in de zure cultures veel van het nitriet verdwijnen. Wordt het echter in noemenswaardige hoeveelheden aangemaakt, dan zal het toch nog wel aantoonbaar moeten zijn, wat bleek uit een 0,04 % $NaNO_2$ oplossing, waarin na 7 dagen bij pH 3,5 nog steeds duidelijk nitriet aan te toonen was.

De getallen gevonden bij de Verticilliumcultures moeten in de natuur altijd minder bedragen dan in cultuur, daar er minder ni-

traat is, minder mycelium, en bovendien door diffusie veel nitriet verdwijnen zal.

Daar Verticillium alboatrum o.a. tomaten sterk doet verwelken, heb ik onderzocht, welke concentraties van $NaNO_2$ noodig zijn om een verwelking bij tomatenplantjes te voorschijn te roepen. Een aantal plantjes werden gezet op de volgende nitrietconcentraties in v. d. Crone oplossing: 0,2 %, 0,1 %, 0,05 %, 0,025 %, 0,01 % en 0,005 %, van elk twee, en bovendien nog twee contrôleplantjes op v. d. Crone zonder nitriet. Elke twee dagen werden de oplossingen vernieuwd.

In tabel XII zien we, dat na 14 dagen de plantjes op concentraties van 0,025 % en minder, volkomen normaal ontwikkeld zijn, en niets zijn achtergebleven bij de contrôles.

Het schijnt dus dat tomatenplanten, althans voor korten tijd een concentratie van 0,025 % KNO_2 verdragen kunnen. s' J a c o b (38) vindt bij Pisum sativum, en Phaseolus vulgaris een sterke nitrietbeschadiging bij een concentratie van 0,03 %, en alleen een vertraagde groei bij 0,015 % KNO_2. Deze planten zijn dus nog iets gevoeliger dan tomaten.

Ook voor schimmels werkt nitriet in bepaalde concentraties sterk toxisch, zooals blijkt uit de volgende proefreeksen.

Van dezelfde Fusariën en Verticillium werden sporen gebracht in reageerbuizen met 10 c.c. Richardsoplossing, waarin KNO_2 was opgelost in de volgende concentraties: 0,5 %, 0,25 %, 0,12 %, 0,06 %, 0,03 % en 0 %.

Na 4 dagen blijken de sporen alleen gekiemd te zijn bij de contrôles.

Na 8 dagen is Fusarium vasinfectum en F. conglutinans ook in de buizen met 0,03 % gekiemd, doch de ontwikkeling blijft hier veel minder dan bij de contrôles. De andere schimmels vertoonen alleen kieming in de contrôlebuizen.

Na 14 dagen begint er in verschillende andere buizen eenige ontwikkeling zichtbaar te worden, doch dan is er al een groot gedeelte van het nitriet verdwenen, dus is deze ontwikkeling van geen belang meer voor onze proef.

Het blijkt dus dat voor al deze schimmels een concentratie van 0,03 % KNO_2 al schadelijk werkt, terwijl een concentratie van 0,025 % voor tomaten al zoo goed als onschadelijk is. Het is dus

wel zeer onwaarschijnlijk, dat de schimmels zooveel nitriet zullen vormen dat de planten erdoor gaan verwelken.

Dat we niet met één enkele stof te doen hebben, blijkt duidelijk als we de toxische werking der stofwisselingsproducten van de schimmels in reincultures verder onderzoeken. De toxinen van Ver-

TABEL XIII

Invloed der verdunning op de toxische werking

verdunning	takjes na 24 uur	takjes na 72 uur
1 1	heele tak slap. bladeren met donkere vlekken.	takjes dood en verdroogd.
1/2 1/2	enkele donkere vlekken. bladranden iets verdroogd.	heele tak slap. stengel gedeeltelijk samengevallen.
1/3 1/3	grootste bladeren slap met enkele donkere vlekken.	alleen grootste bladeren slap. st. gedeeltelijk samengevallen.
1/4 1/4	geen vlekken. bladranden iets beschadigd.	als bij verdunning 1/3.
1/5 1/5	takken normaal.	grootste bladeren weinig slap. stengel weinig samengevallen.
1/6 1/6	" "	als bij verdunning 1/5.
1/7 1/7	" "	als bij verdunning 1/5.
1/8 1/8	" "	takken normaal.
1/9 1/9	" "	" "
contr. op water contr. op Richards.	" " " "	" " " "

ticillium alboatrum zijn vooral onderzocht door Bewley (16). Door koken van de afgefiltreerde cultuurvloeistof duurde het meer dan vier maal zoolang voor de daarop staande tomatentakken begonnen te verwelken dan op de niet gekookte. Als de cultuurvloeistof met alcohol behandeld werd, totdat er geen nieuw neerslag

meer ontstond, dit neerslag gedroogd en weer opgelost werd in water, dan bleek dit water bijna even sterk toxisch geworden te zijn als de afgefiltreerde cultuurvloeistof zelf. Werd dit water met het opgeloste neerslag weer gekookt, dan duurde het ongeveer acht maal zoo lang voor de verwelking intrad. Hij veronderstelt dus dat het een enzym is, dat direct het protoplasma van de plantencellen beschadigt, of dit indirect doet door zooveel gom in de vaten te voorschijn te roepen, dat de watervoorziening te sterk gestoord wordt. Naast dit enzym bestaat een andere stof, die ook toxisch is, doch in veel mindere mate, en die thermoresistent is.

Over het algemeen kon ik deze resultaten bevestigen. Als cultuurvloeistof werd gebruikt 150 c.c. Richards oplossing in 500 c.c. kolven. Hierin werden sporen van Verticillium gebracht en na een maand werden deze cultures afgefiltreerd door een Seitz EK filter. Deze vloeistof werd als uitgangspunt van dit onderzoek gebruikt.

Welke verdunning nog duidelijk toxische werking vertoonde, blijkt uit tabel XIII. Dat de tijden, voordat de verwelking intreedt hier betrekkelijk lang zijn, komt, doordat de afgesneden tomatentakjes op de te onderzoeken vloeistof in een koele omgeving gehouden werden, zoodat de verdamping gering bleef en de vloeistof slechts langzaam in de takjes binnendringen kon. Pas een verdunning van 1 op 8 schijnt de vergiftige werking van de vloeistof te doen verdwijnen. In de gevallen van de sterkste beschadiging zien we vóór het verwelken op de bladeren donkere waterige vlekken ontstaan, waarschijnlijk doordat de cellen daar zoo sterk beschadigd zijn door de toxinen, dat ze gaan plasmolyseeren. Na verloop van tijd gaan ook de cellen van de stengel op verschillende plaatsen plasmolyseeren, en deze valt slap in elkaar.

Tabel XIV geeft de verandering van de toxische werking der cultuurvloeistof door hoogere temperaturen veroorzaakt. Er blijkt naverhitting gedurende 1 minuut op 50 gr. reeds een deel van de toxinen vernietigd te zijn. Als het thermoresistente gedeelte van de toxinen overblijft, dan blijkt de beschadiging niet alleen verminderd, maar ook veranderd te zijn. De geplasmolyseerde plekken op de bladeren treden niet meer op, doch er ontstaat meer een beschadiging aan de bladranden, die slap worden en verdrogen. terwijl de stengel niet op enkele plaatsen samengevallen is,

doch over zijn geheele lengte een groote brosheid vertoont, zoodat bij een geringe buiging de stengel reeds afbreekt.

Bij een verhitten op ongeveer 70 gr. ontstaat in de vloeistof een neerslag, dat echter bij afkoelen weer oplost.

Voegen we alcohol erbij, dan ontstaat er een dik wit neerslag, dat vrij gauw bezinkt, en een heldere vloeistof achterlaat. Bij vergrooting blijkt dit neerslag te bestaan uit een amorphe massa met een groot aantal kleine kristallen erin, die na verdamping van een gedeelte der alcohol verdwijnen. Ook de amorphe massa verdwijnt dan gedeeltelijk. Wordt het neerslag gedroogd, dan blijkt er van

TABEL XIV

Invloed van verhitten op de toxische werking

Ged. 1 min. verhit op:	Takken na 72 uur.
35 gr. 35	tak dood en verdroogd, stengel sterk samengevallen.
50 50	takken slap, bladeren met donkere vlekken en verdroogde randen, stengels voor een klein gedeelte samengevallen.
75 75	grootste bladeren iets slap, met verdroogde randen. stengels zeer bros.
85 85	"
100 100	"

de amorphe massa weinig over te zijn, en het bestaat dan in hoofdzaak uit twee soorten kristallen, die in ongeveer gelijke hoeveelheid aanwezig zijn. Alleen de lange kristallen blijken in water oplosbaar te zijn; de kleine ronde waren niet meer in oplossing te krijgen. Voegen we weer alcohol bij een oplossing van de lange kristallen, dan ontstaat weer een neerslag, dat echter veel melkachtiger is dan het vorige, en veel langzamer bezinkt.

Uit tabel XV volgt duidelijk, dat de oplossing van de lange kristallen slechts weinig minder toxisch is dan de oorspronkelijke vloeistof, en dat na verhitting ook hierbij dezelfde veranderingen in

optreden als bij de oorspronkelijke vloeistof. De stengel wordt bros, terwijl de bladrandbeschadiging blijft, en de vlekkenbeschadiging verdwijnt.

Wordt de afgefiltreerde voedingsvloeistof uitgeschud met chloroform, zoodat er o.a. het grootste deel der vetzuren uit verdwijnt,

TABEL XV

Toxische eigenschap van het alcohol neerslag

Drie takken op:	Na 48 uur.
oplossing van alcoholneerslag	slap, enkele donkere vlekken op de bladeren, rand droog, stengel iets beschadigd.
idem, gekookt	minder slap dan de vorige takken, geen donkere vlekken, wel verdroogde randen, geen stengelbeschadiging.
afgefiltreerde cultuurvloeistof	Takken hangen heelemaal slap, bladeren vol donkere vlekken, stengel sterk beschadigd.
idem, gekookt	Slap, geen donkere vlekken, bladranden verdroogd, stengels bros.

TABEL XVI

Invloed van uitschudden met chloroform op de toxische eigenschappen

Telkens 6 takken op:	Na 48 uur
Vloeistof met chloroform uitgeschud	Takken slap, enkele donkere vlekken, bladranden droog, stengelbeschadiging bij twee takken.
Chloroform extract in water opgelost	Takken blijven normaal.
Vloeistof met chloroform uitgeschud en gekookt	Takken weinig slap, geen donkere vlekken, randen der bladeren hier en daar verdroogd, geen stengelbeschadiging.
Normale afgefiltreerde vloeistof	Takken geheel verwelkt, bladeren vol donkere vlekken, stengels bij alle takken beschadigd.

dan is die vloeistof iets minder toxisch geworden, zooals uit tabel XVI blijkt. De aard der beschadiging is echter dezelfde gebleven. De stoffen, die in de chloroform getrokken zijn, en na verdampen der chloroform opgelost werden in dezelfde hoeveelheid water als de oorspronkelijke vloeistof, vertoonen geen beschadigende werking op tomatentakken.

Al deze feiten maken het waarschijnlijk, dat we met een combinatie van verschillende stoffen te maken hebben, die allen in meerdere of mindere mate een beschadigende invloed uitoefenen op het plantenweefsel, waaronder zoowel enzymen als andere stoffen een rol spelen. De vetzuren, waarvan White enkele sterk toxisch vond voor plantenstengels, werken waarschijnlijk ook mede, doch slechts in geringe mate.

HOOFDSTUK VI

OVER DE MOGELIJKHEID VAN IMMUNISATIE BIJ PLANTEN

Hursh (37 b) vermeldt, dat takjes, die reeds eens behandeld waren geworden, met de extracten van verschillende schimmels, bij een tweede behandeling met deze extracten veel minder gevoelig waren voor de toxinen hieruit. Volgens verschillende auteurs zou dit berusten op een vorming van antitoxinen in het plantenweefsel, evenals dit gebeuren kan in dierlijke weefsels. Waar de resistentie van de planten tegen de parasiteerende schimmels vaak samen zal hangen met het weerstandsvermogen van die planten, tegen de toxische afscheidingsproducten van deze schimmels, zou een vorming van antitoxinen zeer goed de oorzaak kunnen zijn van een hoogere graad van resistentie.

Op deze wijze zouden we dus een passieve immuniteit kunnen verkrijgen bij planten, en zou de serotherapie ook ter bestrijding van plantenziekten zeer goed bruikbaar zijn.

In hoeverre door Hursh werkelijk een verhoogd weerstandsvermogen tegen de toxinen verkregen is, is uit zijn publicatie niet duidelijk na te gaan, daar hij het feit slechts even terloops vermeldt, zonder de proeven nauwkeuriger te omschrijven. Het zou bijvoorbeeld zeer goed mogelijk kunnen zijn, dat hij de eerste keer door versche takken de toxinen liet opzuigen, terwijl bij de tweede behandeling noodzakelijkerwijze de takken reeds geheel met water verzadigd waren, zoodat de toxinenopname veel langzamer verliep. Hij vermeldt trouwens zelf, dat takken, die eerst eenigen tijd op leidingwater gestaan hebben veel minder snel verwelken, dan versche takken.

Door verschillende auteurs, o.a. Blackman (16b) is uitsluitend op theoretische grondslag betoogd, dat de serotherapie in het plantenrijk nooit goede resultaten zal kunnen geven, daar een circuleerend systeem, zooals we dat bij dieren in het bloedvaatstelsel vinden ontbreekt. Als het plantenweefsel in staat mocht zijn om bij injectie van antigenen, evenals dierlijke weefsels antistoffen te vormen, dan zou toch nog slechts een zeer klein gedeelte van de planten deze antistoffen bevatten, daar de antigenen niet over groote afstand verspreid kunnen zijn. De banen waarlangs het water naar boven gevoerd wordt, eindigen elk in een zeer beperkt gebied, en als de antigenen in deze waterbanen gebracht worden, dan worden zij nog slechts overgebracht door de sapstroom naar een zeer beperkt gebied van de plant, zoodat de rest nog even vatbaar voor de infectie blijft. Doelmatig zou een dergelijke behandeling dus in geen geval kunnen zijn.

In de laatste jaren is deze beschouwingswijze echter van verschillende kanten aangevallen, vooral door Carbone & Arnaudi (4, 20, 23), die verschillende positieve resultaten verzamelden, over het immuniseeren van planten. Zij nemen wel een soort circulatie aan, waarbij het sap door de houtvaten heen naar boven en door de zeefvaten naar beneden wordt gevoerd, terwijl bovendien door diffusie door het plantenweefsel heen de circulatie volkomen gemaakt wordt.

Zoo zouden toch stoffen, die in planten geïnjiceerd zijn op de lange duur, door de geheele plant verspreid worden.

Een samenvatting van de litteratuur van de laatste jaren betreffende dit onderwerp vinden we bij Carbone & Arnaudi (20, 23), waarin echter alle onderzoekingen, vooral die met positieve resultaten, geheel kritiekloos overgenomen worden, zoodat het geheel een zeer geflatteerde indruk maken moet.

De serotherapie berust op het feit, dat bij injectie van schadelijke stoffen in weefsels van zoogdieren, hierin z.g. antistoffen ontstaan, die deze schadelijke stoffen onschadelijk maken. Deze antistoffen zijn te verdeelen in verschillende groepen al naarmate hun werking. Als we gedoode bacteriën in de bloedsomloop brengen, dan wekt deze injectie het bloed op tot vorming van een antistof, die deze bacteriën onschadelijk maakt, door ze neer te slaan of te agglutineeren. Ook levende bacteriën van diezelfde

soort worden op diezelfde manier hierdoor neer geslagen of geagglutineerd, zoodat deze onschadelijk gemaakt zijn. Naar hun werking verdeelen we de antistoffen in precipitinen, agglutininen, lysinen en antitoxinen. Bij verhitting van deze antistoffen op ongeveer 56 gr. verliezen ze hun werking en krijgen die soms terug door het toevoegen van normaal bloed, dat dus deze antistoffen niet bevat. We hebben hier te doen met een combinatie van twee stoffen waarvan de een reeds in normaal bloed voorkomt en bij 56 gr. vernietigt wordt, terwijl de andere stof gevormd is onder invloed van de injectie, bij 56 gr. werkzaam blijft, maar voor de werking zelf de zooeven genoemde stof uit normaal bloed noodig heeft. Een dergelijke antistof draagt de naam van amboceptor, terwijl de complementstof uit normaal bloed alexine heet.

Als we bij planten naar de vorming van deze verschillende antistoffen zoeken, worden we hierin zeer bemoeilijkt door het feit, dat we bij talrijke planten reeds spontaan stoffen aantreffen met dergelijke werkingen. Carbone & Arnaudi noemen deze stoffen pseudo-antistoffen, en zij vinden zoowel precipiteerende, agglutineerende als lyseerende en zelfs amboceptoren er onder.

De meeste onderzoekingen naar de onder invloed van antigenen gevormde antistoffen, hebben tot een negatief resultaat geleid, terwijl slechts enkele de vorming van echte antistoffen doen vermoeden. De eerste onderzoekingen op dit gebied vond ik bij Picado (49), in 1921. Hij injiceerde cladodiën van Opuntia met konijnenbloed en verwachtte, dat daardoor haemolysine zou ontstaan. Na verloop van 8 dagen kon hij echter geen spoor ervan aantoonen; evenmin na 35 dagen. Nadat hij nieuwe cladodiën met gisten geïnjiceerd had, kon hij ook geen agglutinine voor deze organismen vinden in het uitgeperste sap ervan. Een derde serie injecties, waarbij hij een suspensie van mais-pollenkorrels in de cladodiën bracht, had meer resultaat. Na 8 dagen trad er een gele verkleuring op. Bracht hij nu van het perssap hieruit eenige druppels bij een pollensuspensie in isotonische suikeroplossing, dan bleek dat sap lytische en agglutineerende eigenschappen te hebben, ten opzichte van deze pollenkorrels. Perssap uit niet geïnjiceerde cladodiën had geen invloed. Liet hij het anti-pollen perssap werken op pollenysuspensies van Sorghum of Coix, dan kwam alleen de agglutineerende eigenschap te voorschijn, niet de lytische. Bij 45 gr.

verdwijnen de lytische eigenschappen, doch komen weer te voorschijn bij toevoeging van normaal perssap, zoodat hij hier een alexine aantoont in plantenweefsel. Na verhitten op 56 gr. komen de eigenschappen niet terug bij toevoeging van normaal perssap.

Nadat in 1922 en 1923 twee publicaties verschenen zijn van Vigliano (66 b) die ik echter niet in handen krijgen kon, en waarin hij in plantenweefsels blijkbaar een aantal agglutineerende, precipiteerende, haemolyseerende en antihaemolytische stoffen aantoonde, zagen in 1924 tot 1929 een aantal publicaties over onderzoekingen op dit gebied het licht vanuit het Instituut voor Serotherapie te Milaan (1, 2, 3, 4, 20, 21, 22, 23). Carbone & Arnaudi (21) konden na inspuiten van takken van Prunus Laurocerasus met bloed geen haemolytische stoffen aantoonen, noch amboceptor, noch alexine. Wordt antityphus agglutinine door de takken opgezogen tot in de bladeren, dan blijkt het geheel onveranderd in het bladextract voor te komen. Het extract van normale bladeren vertoont vaak, doch niet altijd, een agglutineerend vermogen, dat vooral tot uiting komt tegenover typhus bacillen, doch dat geen cholera vibrionen agglutineert. Verhitting op 100 gr. maakt dat dit agglutineerend vermogen geheel verdwijnt. In een volgende publicatie (22) noemen zij de stoffen, die dit agglutineeren veroorzaken „pseudo-antistoffen" die „pseudo-specifiek" zijn. Arnaudi (2) vindt in de houtvaten van Morus alba tijdens de periode van de sterkste groei, een stof, die in tegenwoordigheid van Cavia serum haemolytisch werkt. Bij aanwezigheid van andere sera vertoont deze stof echter antihaemolytische en vaak ook haemoagglutineerende eigenschappen. Hij noemt het een haemolytische pseudoamboceptor. Ten slotte vindt Arnaudi (1) nog dat een met behulp van konijnen bereid antitumaefaciens serum ook binnen een plant werkzaam blijft. Hij laat geraniumtakjes, waarop zich groote gallen bevinden van Bacterium tumaefaciens dit antitumaefaciens serum opzuigen en ziet dan na verloop van tijd de gallen verschrompelen, terwijl de gallen op de contrôletakjes goed blijven. Als hij normale takjes dit serum laat opzuigen, dan vormt een infectie met de bacterie nooit een nieuwe gal.

In 1926 doet Sardina (58) een aantal proeven om antistoffen te laten ontstaan in verschillende planten, als Opuntia, Vicia faba, aardappel, tomaat en komkommer, door ze te injiceeren met extrac-

ten van bacteriëncultures, maar hij komt uitsluitend tot negatieve resultaten.

In 1929 verschijnt een stuk van Kostoff (42) en deze onderzoeker komt tot de conclusie, dat plantenweefsels op dezelfde manier als dierlijke weefsels in staat zijn tot het vormen van antistoffen. Hij slaat bij zijn onderzoekingen een geheel andere weg in dan de andere auteurs. Door verschillende Solanaceeën op elkaar te enten, wordt in de onderstam een precipitine gevormd, dat specifiek reageert met extract van de plant waartoe de ent behoort, en omgekeerd. Hij gebruikt voor dit onderzoek talrijke planten uit de geslachten Solanum, Capsicum, Datura, Physalis, Petunia, Salpiglossis en Nicotiana. Zoowel het aantal van zijn proeven als de methodiek, die gebruikt wordt, zijn voor zoover ik na kan gaan, meer dan voldoende om deze resultaten als vaststaand te aanvaarden. Hij uit tevens het vermoeden, dat Sardina bij zijn negatieve resultaten te weinig antigeen gebruikt heeft.

Beauverie (10) geeft over dit onderzoek van Kostoff een uitgebreide bespreking, vooral over het verband hiervan met enkele verschijnselen, die bij het enten optreden, zooals callusvorming.

Vallen dus over het geheel de pogingen om antistoffen in planten te laten vormen negatief uit, in enkele gevallen schijnt het toch wel gelukt te zijn.

Er bestaat een geval, waarbij de antistoffen zonder eenigen twijfel aangetoond zijn, doch waarbij men op een geheel andere wijze te werk is gegaan dan bij de tot nu toe besproken onderzoekingen. Noel Bernard (15) vond in 1911 dat de knollen van de orchidee Loroglossum hircinum een stof bevatten, die elke ontwikkeling van de endophyt van deze plant Rhizoctonia repens verhinderde. Als hij aseptische stukjes van de knol op een voedingsbodem bracht, en daarop tevens de schimmel uitzaaide, dan ontwikkelde de schimmel zich overal goed, alleen in de omtrek van het knolfragment in het geheel niet. De anti-Rhizoctonia repensstof was dan een klein eindje om het stukje heen in de gelatine der voedingsbodem gediffundeerd. Dat deze stof zeer specifiek is blijkt wel hieruit, dat de ontwikkeling van Rhizoctonia mucoroides, de endophyt van andere orchideeën, en van Rhizoctonia solani er niet door gehinderd wordt. De antistof moet reeds in de kiemplanten ontstaan zijn, toen deze geïnfecteerd werden met de schim-

mel, daar we daarbij in de buitenste cellen een goede ontwikkeling van de schimmel vinden en verder naar binnen toe cellen aantreffen, waarin de schimmel haast niet meer te herkennen is in de half vergane kluwentjes in die cellen. Door de vorming van deze antistoffen van binnen uit is de orchidee in staat om van een parasiet een endophyt te maken.

Deze onderzoekingen zijn herhaald door Nobecourt (47) en door Magrou (45) en door beiden volkomen bevestigd. Werd het knolfragment eerst op 55 gr. verhit of tot op —15 gr. afgekoeld, dan diffundeerde de antistof niet naar buiten. Daar Nobecourt geen „cryolabiele" stoffen aannemen kon, vermoedde hij, dat de antistoffen pas ontstonden als de schimmel in reincultuur antigenen afscheidde en deze op het levende knolfragment inwerkten. Deze veronderstelling is merkwaardig, daar de schimmel in de natuur altijd al in deze knollen voorkomt, en erop inwerkt. Ze bleek dan ook niet juist te zijn, daar Magrou zonder de aanwezigheid van de schimmel in staat was om de antistoffen uit knolfragmenten in de voedingsbodem te laten diffundeeren.

Een ander geval van gedeeltelijke immuniteit bij symbiose vinden we in de bacteriënknolletjes van de Leguminosen. Hiltner & Störmer (35) toonden reeds in 1903 aan, dat planten, die geïnfecteerd waren met sterk virulente bacteriën, en daardoor een groot aantal knolletjes gevormd hadden, volkomen resistent waren tegen minder virulente stammen, die op andere planten wel degelijk knolletjes te voorschijn riepen. Cappelletti vindt in een reeks onderzoekingen (24, 25), dat onder invloed van de bacteriën in de tuberkels daarin een specifiek thermolabiel agglutinine ontstaat, dat hij verantwoordelijk acht voor de vorming van bacteriën tot bacteroiden.

Ook over de mogelijke vorming van antistoffen in gallen van Bacterium tumaefaciens zijn verschillende onderzoekingen gepubliceerd, doch met minder positief resultaat. Erwin F. Smith (64) uit in 1911 een vermoeden, dat planten, die reeds verschillende gallen van deze bacterie dragen, minder gevoelig zijn voor nieuwe infecties, doch hij vermeldt tevens, dat het ook mogelijk is, dat de stammen waarmede hij werkte, in virulentie zijn achteruit gegaan. In zijn talrijke latere publicaties over deze bacteriegallen gaat hij op dit onderwerp nergens meer in, zoodat hij waar-

schijnlijk nooit duidelijk positieve resultaten heeft kunnen krijgen.

Arnaudi (1) ziet, dat als hij drie Pelargoniumplanten, die reeds kankers hebbend door infectie met Bacterium tumaefaciens, vlak boven deze kankers opnieuw infecteert, deze infecties niet opkomen, terwijl de infecties op contrôleplanten wel gelukken. Verbindt hij door middel van een met water gevulde glasbuis een gezonde Pelargonium met een, die reeds kankers draagt, dan wordt na verloop van tijd ook de gezonde plant immuun tegen deze bacterie. Daar het aantal planten waarmee hij gewerkt heeft, nogal te wenschen overlaat, heeft Nobécourt (48) deze proeven herhaald, helaas met nog minder exemplaren en kwam daarbij tot geheel negatieve resultaten. Hij infecteerde een Ricinus, die reeds groote gallen droeg opnieuw, en uit deze infectie ontstond wederom een normaal uitgegroeide gal. Op dezelfde manier ontstond een normale gal op een reeds van te voren geïnfecteerde Euphorbia. Arnaudi (4) doet hierna zijn vorige proeven over, nu met een grooter aantal planten en wederom zijn de resultaten positief, hoewel niet zoo sprekend als bij het eerste onderzoek. Hij doet dertien infecties op planten met gallen, waarvan er negen mislukken, en vier aanleiding geven tot kleine nieuwe gallen, terwijl er van de negen infecties op contrôleplanten twee mislukken, vier aanleiding geven tot kleine gallen, en drie tot groote gallen.

Beauvérie (9) meent dat hij Begoniaplantjes immuun kan maken tegen Botrytis cinerea, door de planten eerst, onder omstandigheden, die minder gunstig voor de infectie zijn, met de schimmel in aanraking te brengen. Is de plant daar door heen gegroeid, dan is zij verder onder alle omstandigheden immuun geworden. In een groote Petrischaal brengt hij zand, steriliseert dit, en brengt er dan enkele Begoniastekjes en de schimmel in. Deze culture blijft eenige dagen staan bij 15 gr., waarbij de schimmel tallooze conidiëndragers vormt, doch niet in staat is de stekjes aan te tasten. Brengt hij nu de culture op 30 gr. dan ontwikkelt de schimmel zich als een vorm zonder conidiëndragers, doch is veel virulenter. Echter worden nu de stekjes nog steeds niet aangetast, terwijl een schaal met contrôlestekjes en de schimmel bij deze temperatuur al dadelijk te gronde gaat. Helaas heeft hij met een zeer gering aantal plantjes gewerkt zoodat we zijn resultaten niet dan onder voorbehoud mogen overnemen.

Een dergelijke manier van immunisatie gebruikte Arnaudi (1) bij het immuniseeren van aardappelschijfjes tegen een bacterie uit de Mesenthericus-groep. Door de bacterie te kweeken onder ongunstige omstandigheden, b.v. in zuur milieu of bij te hooge temperatuur, werd de virulentie minder sterk. Door nu steriele aardappelschijfjes eerst te enten met deze afgezwakte bacteriën, bleken de schijfjes een verhoogde resistentie te ontwikkelen tegen de normaal virulente stam, een resultaat, dat echter nogal variabel uitviel.

Zoja (72) schijnt met een vrij groot aantal planten gewerkt te hebben, zoodat de resultaten meer betrouwbaar zullen zijn. Het is mij echter niet gelukt om haar publicatie in handen te krijgen en ik moet dus volstaan met wat Carbone & Arnaudi (20, 23) over dit onderzoek vermelden. Zij laat een groot aantal tarwezaden kiemen in een waterig extract van Helminthosporium sativum en ziet dan na overplanting in volle aarde of in potten bij deze plantjes een duidelijk grootere resistentie tegen deze schimmel, dan bij de contrôleplantjes. Evenzoo wordt de resistentie sterk vergroot bij plantjes, die gekiemd zijn op extracten van sterk aangetaste bladeren. In totaal heeft zij ongeveer drie honderd planten onderzocht.

Sieden & Trieschmann (62) zagen kans om normale aardappels door injectie met extract van sterk door kankers aangetaste aardappels resistent te maken tegen kanker. Door middel van een glazen buisje werd 1 c.c. binnen in de aardappels gebracht, en na veertien dagen deze tezamen met een aantal contrôle-aardappels in sterk geïnfecteerde grond gepoot. Nu bleken de behandelde bijna immuun te zijn, terwijl de contrôles sterk aangetast werden.

Nobécourt (48) heeft enkele proeven gedaan om boonenplantjes te immuniseeren tegen Botrytis door deze plantjes te begieten met de cultuurvloeistof waarop deze schimmel eenige tijd gegroeid is. Hij deed zijn experimenten als volgt:

Een boonenplantje werd gedurende veertien dagen begoten in totaal met 100 c.c. cultuurvloeistof. Dan werd dit plantje tezamen met vier contrôleplantjes onder een glazen stolp gezet, bij ongeveer 20 gr. en rijkelijk vochtig gehouden. Elk plantje kwam in een aparte pot te staan en in elke pot werd een stukje mycelium van Botrytis gebracht. Door de gunstige omstandigheden voor de

schimmel was weldra het geheele grondoppervlak vlak er mee bedekt. Acht dagen na de infectie is reeds een van de contrôleplantjes te gronde gegaan; 12 dagen er na zijn de drie andere contrôleplantjes dood, terwijl 20 dagen er na het behandelde plantje er nog vrijwel normaal uitziet. Het blijkt, dat de schimmel wel dit plantje aangetast heeft, doch er niet ver in kon doordringen.

Dit experiment werd een keer herhaald, wederom met één proefplant. Dertien dagen na de infectie ging nu de contrôleplant te gronde, terwijl de behandelde normaal bleef doorgroeien.

Verder werden eenige proeven gewijd aan het immuniseeren van Vicia Faba tegen Baccillus carotovorus. Dit gebeurde door in de holle stengel van de planten een bepaalde hoeveelheid gefiltreerde bouillon, waarop deze bacterie gegroeid is, in te spuiten. Het eerste experiment gaat over twee plantjes, waarvan de een 0,25 c.c. en de andere 0.50 c.c. geïnjiceerd krijgt. Veertien dagen later worden beide geïnfecteerd met de levende bacterie, waarna blijkt dat een contrôleplant, en de plant met 0,25 c.c. sterk aangetast worden, terwijl de plant met 0,50 c.c. gezond blijft. Bij een volgend experiment wordt een plant geïnjiceerd met 1 c.c., twee met 0,75 c.c., twee met 0,50 c.c., terwijl drie plantjes dienen als contrôle. Veertien dagen daarna worden al deze plantjes geïnfecteerd, en na twee dagen zijn reeds alle drie contrôleplantjes dood gegaan. Na vier dagen is ook een van de plantjes met 0,50 c.c. dood, terwijl de vier anderen leven blijven, hoewel wel een gedeelte van hun bladeren verdroogt en afvalt.

Helaas is bij deze experimenten het aantal der behandelde plantjes wederom zoo gering gebleken, dat we moeilijk de conclusie, die Nobécourt en enkele anderen hieruit trekken, zonder meer over kunnen nemen, hoewel we in dit onderzoek waarschijnlijk een weg aangewezen zien, om het vraagstuk van immunisatie bij planten aan te vatten.

In 1928 doet A r n a u d i (4) nog eenige proeven over het immuniseeren van erwten tegen Blepharospora cambivora. In vier Petrischalen laat hij steriel erwten kiemen, in de eerste schaal in water, in de tweede in een waterig extract van de levende schimmel, in de derde schaal in een extract van de schimmel, dat gedurende een half uur verhit was op 60 gr. en in de vierde schaal een extract, dat gedurende twee minuten verhit was op 100 gr.

In de tweede schaal ontwikkelde de schimmel zich rijkelijk, zoodat de erwten niet kiemden. Na 8 dagen werden de erwten uit de overige schalen overgeplant in aarden potten, de erwten uit elke schaal bij elkaar in een pot. Negen dagen hierna werden alle planten geïnfecteerd met de schimmel, en zes dagen daarna nog eens. Veertien dagen na de eerste infectiedatum waren alle planten uit de eerste schaal dood, terwijl de planten uit de derde en vierde schaal voor het grootste gedeelte nog levend waren, doch allen wel een zeer sterke infectie vertoonden. Vier en twintig dagen na de eerste infectie waren alle planten dood. Hieruit concludeert hij een duidelijk gelukte immunisatie, die bij de volgende proefreeks zelfs specifiek zou blijken te zijn. Hiertoe brengt hij kiemende erwten in drie Petrischalen, waarvan de eerste gevuld is met water, de tweede met verhit Blephoraspora-extract, en de derde met verhit extract van Aspergillus oryzae. In elke schaal bevinden zich vijftien erwten. Als later deze erwten met Blepharospora geïnfecteerd worden, dan blijken over het algemeen de erwten uit de tweede schaal iets later te gronde te gaan dan die uit de beide andere schalen, die onderling geen verschil vertoonen. Uit de tabel die hij geeft, blijkt echter dat ook het verschil tusschen de eerste en de tweede schaal zeer gering is. Als we de gemiddelde tijd nemen, die verstrijkt tusschen de infectiedatum en de dood der planten, dan krijgen we voor de planten uit de eerste schaal 20,5 dagen, uit de tweede 23,2 en uit de derde schaal 21 dagen. Om uit dergelijke gegevens tot duidelijk positieve resultaten te besluiten, lijkt me wel eenigszins voorbarig, te meer daar het telkens slechts over 15 planten gaat.

Dit zijn in het kort de experimenten, die over het onderwerp van immunisatie bij planten gepubliceerd zijn, en het is dus niet twijfelachtig, of er zijn nog vele open vragen op dit gebied.

Hoewel verschillende onderzoekingen duidelijk pleiten voor de mogelijkheid van immuniseeren, zal toch de serotherapie nooit die plaats in de phytopathologie innemen, als zij dat doet in de medische wetenschap. Het resistent maken van planten voor verschillende ziekten zal altijd wel meer een taak blijven voor de genetici dan voor de serologen. Toch lijkt het me niet onwaarschijnlijk, dat voor enkele gevallen een behandeling met antigenen doelmatig zal blijken.

Een voornaam punt hiervoor is de sterkte en de duur van de verkregen resistentie. Ik ontmoette tot nu toe slechts twee gevallen van een volkomen immuniteit, n.l. bij Nobécourt, die boonen tegen Botrytis, en Vicia Faba tegen Baccillus carotovorus immuniseerde. Zooals we zagen is echter het aantal der behandelde planten te gering, om er veel waarde aan te hechten. Zoja (72), wier experimenten over een voldoend aantal exemplaren gaan, vindt geen volkomen immuniteit, doch slechts een sterk verhoogde resistentie. Evenzoo verkrijgen Sieden & Trieschmann (62) ook geen volkomen immuniteit.

In de beide laatst aangehaalde onderzoekingen hebben we te doen met gevallen, waarin de vergrooting der resistentie, zoowel als de tijd gedurende welke de resistentie blijft, beide een belangrijke waarde hebben verkregen. Hoewel in deze speciale gevallen een dergelijke behandeling in de praktijk niet loonend zal kunnen zijn, daar het uitplanten van gekiemde rogge evenals het immuniseeren van pootgoed bij aardappels wel te kostbaar moet worden, blijft het toch zeer goed denkbaar, dat dergelijke behandelingen loonend kunnen zijn voor bloemkweekerijen, waar de waarde per plant veel grooter is.

Het is dus wenschelijk dat een poging in deze richting gedaan wordt, waardoor dan tevens meer licht geworpen zal worden op de mogelijkheid van verkregen immuniteit in het plantenrijk.

HOOFDSTUK VII

SAMENVATTING

1. Verticillium alboatrum Rke & Berth in den ruimsten zin genomen, valt uit elkaar in twee groepen, waarvan de eene een zwart stroma vormt door een zeer groot aantal microsclerotien, de andere door zwarte hyphen. De eerste groep blijft in reincultuur op Richards oplossing zich uitsluitend aan de oppervlakte ontwikkelen, terwijl de tweede groep door de geheele cultuur heen groeit. Beide groepen vormen alle overgangen van zeer donker tot kleurloos, zonder dat het vermogen tot pigmentvorming eenige invloed heeft op de virulentie. Door overenten van uitsluitend kleurloos luchtmycelium kan uit een donkere stam een kleurlooze ontstaan.

2. Stammen, die het vermogen hebben om pigment te vormen, doen dit uitsluitend bij aanwezigheid van koolhydraten, van een ruime voorraad magnesium, en binnen de grenzen van een bepaalde zuurgraad.

3. Bij gebrek aan phosphor is de ontwikkeling van de schimmel slecht en ontstaan er in de hyphen een zeer groot aantal uiterst regelmatige oliedruppels. Ook bij zwavelgebrek ontstaan er oliedruppels, doch deze zijn lang niet zoo regelmatig over de hyphen verdeeld.

4. De stikstofbron is in reincultures van zeer groot belang voor de ontwikkeling der schimmel, zoowel rechtstreeks als door de zuurgraadverschuiving, die erdoor teweeg wordt gebracht. Het beste worden ammoniumionen gebruikt, bijna evengoed kan asparagine als N-bron dienen, nitraationen kunnen ook gebruikt worden doch veel minder goed, ureum wordt door sterke urease-

afscheiding al gauw gehydrolyseerd tot ammoniak. Nitraat kan alleen dan als stikstofbron dienen als er geen ammoniumionen in de oplossing zijn.

5. De zuurgraad der cultures met een ammoniumzout van een sterk zuur bereikt snel de uiterste zuurgrens voor den groei, cultures met zouten van zwakkere zuren gaan naar diezelfde grens, doch veel langzamer; cultures met nitraat bereiken bij pH 8 ongeveer een evenwicht; cultures met ureum bereiken daar een evenwicht, waar de ammoniakvorming even groot is als het ammoniumverbruik. Komt dit evenwicht te liggen boven de alcalische grens voor de groei, dan houdt het ammoniumverbruik op, terwijl de ammoniakvorming doorgaat, zoodat de culture zoo alcalisch wordt, dat de schimmel afsterft.

6. Hoewel het voor de hand ligt dat, door de betere ontwikkeling der schimmel de natuurlijke infectie van tomaten met Verticillium sterker zal zijn, als de grond met ammoniumzouten bemest wordt, blijkt dit niet uit de proeven, die hier beschreven zijn.

7. Wel blijkt een sterkere infectie bij een grootere hoeveelheid stikstof in de grond.

8. Fusariumsoorten uit de elegansgroep, die verwelkingsziekten veroorzaken, blijken physiologisch zeer dicht bij elkaar te staan, doch in enkele opzichten te verschillen van Verticillium.

9. Als de roode kleurstof gevormd wordt, gebeurt dit ook alleen bij aanwezigheid van koolhydraten, van een ruime hoeveelheid magnesium, en van een bepaalde zuurgraad.

10. Ook hier wordt veel olie gevormd in de hyphen bij phosphorgebrek, doch niet in zulk een regelmatige vorm als bij Verticillium.

11. Evenals Verticillium gebruikt ook Fusarium het best ammoniumionen als N-bron; bijna evengoed kan asparagine gebruikt worden, veel minder goed nitraat. Ureum wordt sterk gehydrolyseerd. Een verschil tusschen waarschijnlijk alle Fusariumsoorten en Verticillium is, dat Fusarium bij aanwezigheid van ammonium toch tegelijk nitraat kan gebruiken.

12. Bij infectieproeven van asters met Fusarium bleek duidelijk de infectievergrootende en versnellende invloed van een ammoniumbemesting. Ook bleek hier de sterkere infectie bij grootere stikstofconcentratie in de grond.

13. De nitriethypothese van Rosen is niet houdbaar, daar zoowel verschillende Fusariumsoorten als Verticillium in reinculture niet zooveel nitriet maken als noodig is om planten te doen verwelken, en bovendien nitrieten even schadelijk zijn voor de schimmels als voor de planten.

14. Het verwelken van de aangetaste planten gebeurt niet door een, maar door talrijke onbekende stoffen, die de schimmel afscheidt, en die allen meer of minder schadelijk zijn voor de planten.

15. Een overzicht wordt gegeven over de litteratuur op het gebied van immunisatie bij planten.

LITTERATUURLIJST

1. ARNAUDI, C., Sull'immunita acquisita nei vegetali.
   1925, Atti della Societa Italiana di Scienze Naturali. Vol. LXIV p. 230—238.
2. ———— Sopra uno pseudoambocettore emolitico del gelso.
   1925, Bollettino dell'Istituto Sieroterapico Milanese. Fasc. VI p. 3—11.
3. ———— A propos de quelques expériences sur l'immunité acquise chez les végétaux.
   1927, Revue de Path. végétale et Entem. agricole. Tome XIV.
4. ———— Nuove esperienze sulla vaccinazione delle piante.
   1928, Rivista di Patologia vegetale. Anno XVIII N. 7—8 p. 1—8.
5. BAINIER, A., Bull. trim. de la Société Mycologique.
   1906, Tome XXII p. 222.
6. BARNUM, C. C., The production of substances toxic to plants by Penicillium expansum Link.
   1924, Phytopathology Vol. XIV p. 238.
7. DE BARY, A., Ueber einige Sclerotinien und Sclerotienkrankheiten.
   1886, Bot. Zeitung Bd. 44.
8. BEACH, W. S., Fusariumwilt of China-asters.
   1918, 20th Mich. Acad. Sci. Rept.
9. BEAUVERIE, J., Essais d'immunisation des végétaux contre les maladies cryptogamique.
   1901, Comptes rend. de l'Acad. des Sciences. Tome 133 p. 107.
10. ———— Un nouvel aspect de la question de l'immunité chez les plantes.
    1929, Rev. de Bot. appliqué et Agr. trop. Vol. IX p. 293—297, 371—376.
11. BEHRENS, J., Beiträge zur Kenntnis der Obstfäulnis.
    1898, Centralbl. f. Bakt. Abt. 2 Bd. IV.

12. BERKELEY, C. H., Rept, of the Dominion Field Lab. of plant pathology, Ontario. In Güssow: Rept of the Dominion Botanist for 1926, Canada Dept. of Agriculture.
1927, Ottawa p. 91—100.
13. ———————— Idem. Rept. for 1927. Canada Dept. of Agric.
1928, Ottawa p. 132—133.
14. BERKELEY, G. H. & JACKSON, A. B., Blue stem of black and red raspberry.
1924, Phytopathology Vol. XIV p. 347—348.
15. BERNARD, N., Remarque sur l'immunité chez les plantes.
1909, Bull. de l'institut Pasteur. Tome 7 p. 369.
16. BEWLEY, W. F., Sleepy disease of tomato.
1922, Ann. appl. Biol. Vol. 9 p. 116—134.
16 b. BLACKMAN, V. H., Discussion on some similarities and dissimilarities between plant- and animal diseases with special reference to immunity and virus diseases.
1922, Brit. Med. Journ.
17. BOAS, F., Weitere Untersuchungen über die Bildung Stärkeähnlicher Substanzen bei Schimmelpilze.
1917, Biochem. Zeitschrift. Bd. 81 p. 80—86.
18. BOAS, F. & LEBERLE, H., Untersuchungen über Säurebildung bei Pilzen und Hefen.
1919, Biochem. Zeitschrift. Bd. 95 p. 170—178.
19. BROWN, W., On the physiology of parasitism.
1917, The new Phytologist. Vol. XVI p. 109—127.
20. CARBONE, D., Ueber die aktive immunisierung der Pflanzen.
1928, Centralbl. f. Bact. Bd. 76 p. 428—437.
21. CARBONE, D. & ARNAUDI, C., Nuove esperienze sulle reazione immunitarie delle piante.
1924, Atti della Soc. Ital. di Scienze Naturali. Vol. LXIII p. 269—278.
22. ———————— Ancora sulle reazioni immunitarie delle piante.
1925, id. Vol. LXIII p. 351—361.
23. ———————— L'immunita nelle piante.
1930, Monografie dell' Istituto Sieroterapico Milanese.
24. CAPPELLETTI, C., Reazioni immunitarie nei tubercoli radicali delle leguminose.
1923, Giornale di Biologia e Medicina sperimentale V. 1 N. 6.
25. ————————Reazioni immunitarie nei tubercoli radicali delle leguminose.
1924, Annali di Botanica V. 16 n. 2.

26. CZAPEK, F., Untersuchungen über die Stickstoffversorgung und Eiweiszbildung der Schimmelpilze.
1902, Beitr. Chem. Physiol. u. Pathol. Vol. 1 p. 538—560, Vol. 2 p. 557—590.
27. ———— Biochemie der Pflanze.
1920, Vol. 2 p. 167.
28. DOWSON, W. J., The wilt disease of Michaelmas Daysies.
1923, Journ. of the Royal Hort. Soc. Vol. XLVIII p. 38—57.
29. DUFRENOY, M. J., Production de nitrites par des Verticillium en culture pur.
1927, Bull. de la Soc. de Chimie Biologique. Tome IX p. 935.
30. GOSS, R. W., Potato wilt and stem end rot caused by Fusarium Eumartii.
1924, Nebr. Agr. Exp. St. Res. Bul. 27.
31. GORBACH, G., Zur Kenntnis des Farbstoffes des Bacillus prodigiosus.
1929, Centralbl. f. Bact. Bd. 79 p. 26—50.
32. HASKELL, R. J., Fusarium wilt of potato in the Hudson river Valley.
1919, Phytopathology Vol. 9 p. 223.
33. HAYMAKER, H. H., Relation of toxic excretory products from two strains of Fusarium Lycopersici to tomato wilt.
1928, J. Agr. Res. Vol. 36 p. 697.
34. HIBINO, S., Conditions influencing the production of coloning mutter of Monascus purpureus Went.
1925, Kon. Acad. v. Wetensch., Amsterdam. Proceedings Vol. XXVIII p. 182—190.
35. HILTNER & STORMER, Neue Untersuchungen über die Wurzelknöllchen der Leguminosen und deren Erreger.
1903, Arb. Biol. Anst. f. Land- u. Forstwirtschaft am K. Gesundheitsamt.
36. HOAGLAND, D. R., & DAVIS, A. R.
1923, J. Gen. Physiol. Vol. 5 p. 629.
37. HOOK, J. M. VAN, Diseases of Ginseng.
1904, Cornell Univ. Agr. Exp. St. Bul. 219 p. 168—174.
37 b. HURSH, C. R., Sur la toxicité des milieux de culture des champignons phytopathogènes.
1925, Rev. Path. vég. et Entom. agr. Tom. XII p. 137.
38. S'JACOB, J. C., Anorganische beschadigingen bij Pisum sativum en Phaseolus vulgaris.
1927, Diss. Baarn.

39. JACKSON a. b., The Fusarium wilt of China asters.
1927, Scientific Agriculture Vol. 7 p. 230.
40. KLEBAHN, H., Beiträge zur kenntnis der Fungi imperfecti.
1913, Mycol. Centralbl. Bd. 3 p. 49.
41. KLOTZ, L. J., Studies on the physiology of fungi. XVI. Some aspects on nitrogen metabolism in fungi.
1923, Ann. Missouri Bot. Gard. 1923, p. 299—368.
42. KOSTOFF, D., Acquired immunity in plants.
1929, Genetics Vol. XIV p. 36—78.
43. LEK, H. A. A. VAN DER, Onderzoekingen over tracheomycosen.
Med. Landbouwhoogeschool te Wageningen, deel XV.
44. LUTZ, C., Sur l'assimilaoilitée comparée des sels ammoniacaux, des amines, des amides et des nitriles.
1905, Comptes rend. de l'Acad. Paris. Vol. 140 p. 665—667.
45. MAGROU, J., L'immunité humorale chez les plantes.
1924, Revue de Path. Vég. et Ent. Agr. Tome XI p. 189—192.
46. MEER, J. H. H. VAN DER, Verticilliumwilt of herbaceous and woody plants.
1925, Med. Landbouwhoogeschool Wageningen. deel XXVIII.
47. NOBECOURT, P., Sur la production d'anticorps par les tubercules d'Ophrydées.
1923, Comptes rend. de l'Acad. des sciences. Tome 177 p. 1055.
48. ———— Contribution à l'étude de l'immunité chez les végétaux.
1928, 2nd ed. Barlier. Tunis.
49. PICADO, C., Annales de l'institut Pasteur.
1921, Tome 35 n. 12.
50. ———— Sur l'action à distance des champignons phytopathogènes.
1923, Congrès de Path. Végétale à Strasbourg.
51. PRAT, S., The toxicity of tissue juices for cells of the tissue.
1927, Am. Journ. Bot. Vol. 14 p. 120.
52. REINKE, J. & BERTHOLD, G., Die Zersetzung der Kartoffel durch Pilze.
1879, Unters. a. d. Bot. Lab. d. Univ. Göttingen. p. 7-100.
53. RITTER, G. E., Ber. d. Deutsche Bot. Ges.
1909, Bd. 27 p. 582.
54. ———— id.
1911, Bd. 29 p. 570.

55. ROBBINS, W. J., Am. Journ. Bot.
1923, Vol. 10.
56. ROBBINS, W. J. & SCOTT, I. T., J. Agr. Res.
1925, Vol. 31 p. 385.
57. ROSEN, H. R., Efforts to determine the means by which the cottonwilt fungus induces wilting.
1926, J. Agr. Res. Vol. 33 p. 1143.
58. SARDINA, R. J., Zur Frage der Antikörperbildung bei Pflanzen.
1927, Angewandte Botanik Bd. VIII.
59. SCHAFFNITT, E. & VOLK, A., Ueber den Einflusz auf die Empfänglichkeit der Pflanzen für Parasiten.
1927, Forsch. auf dem Geb. d. Pfl. und der Immunität im Pflanzenreich Heft 3.
60. SIDERIS, C. P., Studies on the behaviour of Fusarium cromyophthoron in carbohydrates, glucosides, etc.
1925, Phytopathology Vol. 15 p. 129.
61. ———— The effect of the H-ion concentration of the culturesolution on the behaviour of Fusarium, etc.
1929, Phytopathology Vol. 19 p. 233.
62. SIEDEN & TRIESCHMANN, Ein neuer Weg zur bekämpfung des Kartoffelkrebses?
1926, Mitt. a. d. Deutschen Landwirtsges. n. 42.
63. SMITH, R. E., The parasitism of Botrytis cinerea.
1902, Bot. Gaz. Vol. XXXIII.
64. SMITH, E. F., Bacteria in relation to plant diseases.
1911, Carnegie Inst. Wash. Vol. II p. 93.
65. STERNBERG, R. A., Am. J. Bot. Vol. 6 p. 330.
1919.
66. TAMYA, H., Acta phytochimica Vol. III p. 1.
1927.
66 b. VIGLIANO, C., Sulla presenza nelle piante di sostanze agglutinanti, precipitanti, emolizzanti ed antiemolitiche.
1922, Boll. Ist. Sieroterapico Milanse.
67. WESTERDIJK, J. & LUYK, A. VAN, Ueber einige Gefäszkrankheiten.
1924, Med. uit het Phytopath. Lab. W. C. Scholten VIII p. 48—50.
68. WHITE, R. P., Studies on tomato wilt.
1927, J. Agr. Res. Vol. 34 p. 197—239.
69. WILLIAMS, P. H., The effect of some compounds on Verticillium wilt of tomato.
1928, Exp. and Res. St. Cheshunt. Ann. Rept. 1927 p. 38—41, 1928 p. 36—38.

70. WOLLENWEBER, H. W., Die Wirtelpilz-Welkekrankheit.
1929, Arb. a. d. Biol. Reichsanst. f. Land- u. Forstwirtsch. Bd. 17 p. 273—299.
71. WOLPERT, F. S., Studies on the Physiology of Fungi XVII.
1924, Ann. Missouri Bot. Gard. Vol. XI p. 43—97.
72. ZOJA, A., L'immunita nelle piante.
1924, Atti del Regio Istituto Bot. dell' Univ. Pavia.